

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-201582
(43)Date of publication of application : 05.09.1987

(51)Int.Cl. C12N 15/00
C12N 1/20
C12P 21/00
//C12N 1/20
C12R 1:19)
(C12P 21/00
C12R 1:19)

(21)Application number : 61-043531

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO
TEIJIN LTD

(22)Date of filing : 28.02.1986

(72)Inventor : HORIKOSHI KOKI
KUDO TOSHIAKI
KITAI KAZUO
NAKAMURA SATOSHI

(54) PRODUCTION OF NOVEL PLASMID, MICROBIAL CELL AND HUMAN IMMUNOGLOBULIN G FC FRAGMENT PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the secretion of globulin G by a periplasm of *E.coli*, by introducing a DNA region coding Fc fragment of human immunoglobulin G into a plasmid together with four kinds of other specific DNA regions and transforming *E.coli* with the produced plasmid.

CONSTITUTION: A DNA region coding an Fc fragment protein of human immunoglobulin G (a DNA region coding the polypeptide corresponding to the region from 32nd to the 254th of the amino acid sequence shown in the figure) is introduced into a plasmid together with a DNA region containing (A) a DNA region having promoter function to control the expression of said protein and (B) a DNA region coding a signal peptide and a DNA fragment containing (C) a DNA region imparting a host cell with an activity to promote extracellular secretion (preferably originated from plasmid PMB9) and (D) a DNA region having a promoter function to control the expression of the above DNA region. *E.coli* is transformed with the plasmid prepared by the above process. The DNA regions (A), (B) and (D) are preferably originated from alkalophilic *Bacillus* No.170 strain.

⑫ 公開特許公報 (A) 昭62-201582

⑬ Int. Cl. *	識別記号	府内整理番号	⑭ 公開 昭和62年(1987)9月5日
C 12 N 15/00		7115-4B	
1/20		7115-4B	
C 12 P 21/00		6712-4B	
/(C 12 N 1/20			
C 12 R 1:19)			
(C 12 P 21/00			
C 12 R 1:19)			
			審査請求 未請求 発明の数 3 (全38頁)

⑮ 発明の名称 新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質の製造法

⑯ 特願 昭61-43531
⑯ 出願 昭61(1986)2月28日

⑰ 発明者 捷 越 弘 誠 東京都練馬区桜台4-39-8
⑰ 発明者 工 藤 俊 章 東京都目黒区平町1-21-20-606
⑰ 発明者 北 井 一 男 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内
⑰ 発明者 中 村 聰 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内
⑯ 出願人 理化研究所 和光市広沢2番1号
⑯ 出願人 帝人株式会社 大阪市東区南本町1丁目11番地
⑰ 代理人 井理士 有我 軍一郎

明細書

1. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質の製造法

2. 特許請求の範囲

(i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び

ii) 菌体外分認を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、

を含むプラスミド。

(ii) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域が、第 1 図に示されたアミノ酸配列の 32番目 (Thr) から 254 番目 (Lys) までによって示されたポリペプチドをコードする D

NA 領域を少なくとも含むことを特徴とする第 1 項記載のプラスミド。

(iii) 第 1 項 i) におけるプロモーター機能を有する

DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus us) № 170 株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第 1 項記載のプラスミド。

(iv) シグナルペプチドをコードする DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus) № 170 株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第 1 項記載のプラスミド。

(v) 實質的に菌体外分認を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域が、プラスミド M B 9 由来であることを特徴とする第 1 項記載のプラスミド。

(vi) 第 1 項 ii) におけるプロモーター機能を有する DNA 領域が、好アルカリ性バチルス (Bacillus us) № 170 株の染色体 DNA 由来であることを特徴とする第 1 項記載のプラスミド。

(vii) プラスミド p EX F C 10 である第 1 項記載のプラスミド。

(8) プラスミド pEXFC100 である第1項記載のプラスミド。

(9) i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び
ii) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、
を含むプラスミドによって形質転換された組換え微生物細胞。

9a) 諸微生物細胞がエシェリヒア (Escherichia) 属に属することを特徴とする第9項記載の微生物細胞。

9b) 諸微生物細胞がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) H B101 株であることを特徴とする第9項記載の微生物細胞。

9c) i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を

コードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域及びシグナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び

ii) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与える DNA 領域及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域を有する DNA 断片、

を含むプラスミドによって形質転換された組換え微生物を、菌体外にヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質が生成・蓄積するまで培養を行ない、培養物からヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を採取することを特徴とするヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質の製造法。

9d) 諸微生物がエシェリヒア (Escherichia) 属に属することを特徴とする第12項記載の製造法。

9e) 諸微生物がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) H B101 株であることを特徴とする第12項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(1) 技術分野

本発明はヒト免疫グロブリン G (以下 "Ig G" と略すことがある) Fc 領域蛋白質コードする DNA 断片を有する新規組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された新規組換え微生物細胞、及び該微生物を用いたヒト Ig G Fc 領域蛋白質の菌体外分泌による製造方法に関する。

(2) 発明の背景

すべての脊椎動物の体液中に存在し、抗原と特異的に結合する能力を有する蛋白質が抗体であり、抗体蛋白質と構造的、機能的関連をもつ蛋白質は総称して免疫グロブリンといわれている。免疫グロブリン (以下 "Ig" と略すことがある) は、物理化学的あるいは免疫学的な性状から、Ig G、Ig A、Ig M、Ig E、Ig D の 5 つのクラスに分類される。

なかでも Ig G は細菌やウイルスに対する生体防御に重要な役割をもっており、従来より、ヒト Ig G を多量に含むマーグロブリン蛋白質をヒトの血液より分離し、一部変性することにより重症患

者のための免疫製剤として用いられてきた。しかしながら、これは原料を人血に依存しており、その大量の安定した入手が困難であること、またそのため均質で安全なものを常時得にくいという難点があった。そこでヒト免疫グロブリンを遺伝子操作技術によって産出することができれば、医薬品製造のために極めて有利であることは論を待たない。

さて、ヒト Ig G は 2 本の H 鎮 (heavy chain) と 2 本の L 鎮 (light chain) がジスルフィド結合で結ばれた形をとる。ヒト Ig G 分子にババインなどの蛋白質分解酵素を作用させると分子中央で切断され、抗原結合活性のある断片 (Fab 領域蛋白質) と、抗原結合活性はなく条件により結晶化しやすい断片 (Fc 領域蛋白質) とに分かれる。Fab 領域蛋白質は L 鎮全体と H 鎮のアミノ末端側の半分を含み、1 分子の Ig G から 2 分子の Fab 領域蛋白質が生じる。一方、H 鎮のカルボキシル末端側の半分である Fc 領域蛋白質は、ヒンジ (h)、C_α 2、C_α 3 の 3 つの部位より成り、

ヒンジ部位において2本の鎖がジスルフィド結合によって結ばれている。そして、F c領域蛋白質はエフェクター (effector) 機能を有している。従来、ターグロブリン型剤は、無 (低) ターグロブリン血症への補充、ウイルス感染症の予防と治療投与、等に適用されてきた。近年、ターグロブリン型剤が特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療に有効であり (P. Leimbachら, Lancet, 1, 1228(1981))、特にそのF c領域が重要であることが示唆されている (朴ら, 臨床免疫, 15 (Supp 1, 7) 76(1983))。また、全身性エリテマトーデス (SLE) 等における腎系球体沈着免疫複合体が、ヒト Ig G F c領域蛋白質の添加により溶解したという報告もある (河住ら, 臨床免疫, 16, 240(1984))。以上のように、F c領域蛋白質は、ITPやSLEのような自己免疫疾患の治療薬として用いることができる可能性があるが、作用機序などを含めて不明な点が多い。十分な量のF c領域蛋白質を供給できないことが、この理由の1つとなっている。

端に20~40残基程度のアミノ酸からなるシグナルペプチドといわれるものがついた状態で産生され、細胞膜を透過し分泌されるときにシグナルペプチダーゼという酵素によってシグナル領域が切断されて、蛋白質が外に分泌される。この構造は基本的に高等生物でも微生物でも同様に考えられ、本来分泌されない蛋白質にシグナルペプチドをつけてやることによって、細胞膜を透過させることも可能なわけである。

大腸菌 (エシケリヒア・コリ *Escherichia coli*) は、その周囲を内膜・外膜という二つの膜で囲まれており、内膜と外膜との間にはペリプラズムと呼ばれる空間が存在する。従って、シグナルペプチドを用いることにより内膜を通過した蛋白質は、外膜を通過できないためペリプラズムに蓄積してしまうことになるため、大腸菌における本当の意味での菌体外分泌を考えた場合、シグナルペプチドのみでは不充分である。

近年、本発明者らの一部は、プラスミドベクタ- pMB9 (R.L. Rodriguezら, Molecular Mech-

近年の遺伝子操作技術の発達により、種々の有用蛋白質の微生物等を用いた生産が可能になった。しかしながら、通常、有用蛋白質は生として菌体内に蓄積されるものであり、所望の有用蛋白質を菌体外に分泌する微生物は限られたものしか知られていない。有用蛋白質を微生物菌体内に產生させた場合には菌体体積を越える生産量は期待できないが、菌体外に分泌させれば有用蛋白質の、より多量の生産が可能になる。また、宿主微生物に對して toxic な有用蛋白質や、菌体内プロテアーゼに高感受性な有用蛋白質の生産においても、菌体外分泌が有利である。さらに、一般に分泌性蛋白質の種類はそれほど多くないため、有用蛋白質を菌体外に分泌させればその精型工程の簡略化が期待でき、工業的にみてコストダウンがかかる。以上の理由により、所望の有用蛋白質を生産し、菌体外に分泌するような微生物を任意に創製することができれば、その産業上の利用性は極めて大きい。

一般に菌体外に分泌される蛋白質は、アミノ末

anisms in the Control of Gene Expression, ICN-UCLA, symp. Mol. Cell. Biol. (ed. D.P. Hirschら), V, 471, Academic Press Inc., New York (1976) を用い、好アルカリ性バチルス (*Bacillus*) №170 様 (FERM BP-467) 由来の染色体 DNA より、ペニシリナーゼ遺伝子の大腸菌によるクローニングに成功した (T. Kudoら, J. Bacteriol., 156, 949(1983))。

この際に、ペニシリナーゼ蛋白質の大腸菌菌体外への分泌が見られ、pMB9プラスミド上に存在するプロモーターを持たない K11 遺伝子を、好アルカリ性バチルス №170 様由来の DNA 断片中のペニシリナーゼ遺伝子近傍に存在するプロモーター活性を有する領域 (E × プロモーター) により活性化させることにより、大腸菌外膜の透過性が増大していることが明らかとなった (堀越、現代化学, 176, 56(1985))。

そこで、本発明者らは、この菌体外分泌に関する研究を更に進めた結果、ヒト Ig G, F c領域蛋白質の菌体外分泌発現に成功し、本発明を完成

するに至ったものである。

(3) 発明の目的

本発明の目的は、ヒト Ig G Fc 領域蛋白質をコードする DNA を含む DNA 断片及びその断片が組み込まれた新規組換えプラスミドを提供することにある。

本発明の他の目的は、上記新規組換えプラスミドによって形質転換され、目的とするヒト Ig G Fc 領域蛋白質を、菌体外に產生し得る新規組換え微生物細胞を提供することにある。本発明の更に他の目的は、該微生物細胞を用いてヒト Ig G Fc 領域蛋白質を菌体外分泌產生させる方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、以下の説明により一層明らかになるであろう。

(4) 発明の構成

本発明者の研究によれば、前記本発明の目的は、i) ヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質をコードする DNA 領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域、及びシ

グナルペプチドをコードする DNA 領域を有する DNA 断片、及び、

ii) 實質的に菌体外分泌を促進する作用を有する細胞に与える DNA 領域、及び該 DNA 領域の発現調節を行なうプロモーター機能を有する DNA 領域、

を有する DNA 断片を含むプラスミド、そのプラスミドによって形質転換された微生物細胞及びその微生物細胞を用いてヒト免疫グロブリン G Fc 領域蛋白質を菌体外分泌產生させる方法を提供することによって達成されることがわかった。

以下、本発明について更に詳細に説明する。

(ヒト免疫グロブリン G Fc 領域遺伝子のクローニング)

ヒト Ig G を產生する細胞、たとえばヒト骨髓腫細胞 AR H77株 [K.H.Burkら, J.Cancer Res., 38, 2508(1978)] を、適當な条件下、たとえば37℃、炭酸ガス濃度5%で培養増殖させ、得られた細胞を遠心分離によって集める。この細胞を、たとえばラウリル硫酸ナトリウム (SDS) のよう

な界面活性剤存在下で、たとえばプロテアーゼ K のような蛋白質分解酵素を用いて溶解させる。さらに、たとえばフェノールによる抽出によって除蛋白質を行ない、ヒト染色体 DNA を得る。

こうして得られた DNA を、たとえば Bc o RI のような制限酵素で切断し、適當なファージ・ベクター、たとえばシャロン 4 A ベクター (F.R.Bittnerら, Science, 196, 161(1977)) と連結した後、イン・ヒトロ・パッケージング (A.Becker ら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 581(1975)) を行ない、ヒトの遺伝子ライブラリーを得る。Bc o RI 以外の制限酵素を用いる場合や、クローニングサイトとして Bc o RI をもたないような他のファージ・ベクターを使用する場合には、適當なリシンカ-DNA を用いれば遺伝子ライブラリーの作成が可能になる。

この遺伝子ライブラリーのファージを、たとえばエシェリヒア・コリ L B392 株 (ATCC 33572) に感染、ブラークを形成させ、たとえばブラーク・ハイブリダイゼーション法 (W.B.Benton ら,

Science, 196, 180(1977)) によって目的クローニングの選択を行なう。プローブとしては、たとえばニックトランスレーション法 (P.W.J.Rigby ら, J.Mol.Biol., 113, 237(1977)) により³²P 標識を行なったヒト免疫グロブリン H 領域 (Fab) 領域の中の一部であり、抗原結合活性を有する可変部とエフェクター機能を有する定常部との境界に存在) 遺伝子や、あるいはヒト Ig G Fc 領域蛋白質のアミノ酸配列に対応すると考えられる塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを化学合成した後、これを³²P 標識したもの用いることができる。

このブラーク・ハイブリダイゼーションによって陽性を示したクローニングの制限酵素切断点地図を作成し、ヒト染色体由来の DNA 断片を、たとえば p B R 322 (F.Bolivar ら, Gene, 2, 95(1977)) のようなプラスミド・ベクターにサブクローニングする。得られたサブクローニングの挿入部分の DNA 塩基配列を、たとえばマキサム・ギルバート法 (A.M.Maxam ら, Methods Enzymol., 65, 499

(1980)】あるいはM13ファージを用いたジデオキシ・チューン・ターミネーション法 (J. Messing ら, *Nucleic Acids Res.*, 9, 309(1981)) の方法により決定し、ヒト Ig G Fc 領域遺伝子の存在を確認する。第1図に、ヒト Ig G Fc 領域蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードするDNA塩基配列の一例を示す。

こうして得られたヒト Ig G Fc 領域遺伝子は、ヒト染色体のものであるから、実際にアミノ酸をコードしないインtron (intron) を含んでおり、このままでは微生物中で発現させることはできない。そこでこの Fc を領域遺伝子を適当な制限酵素で切断し、インtron の部分を完全に除去する。この制限酵素切断の際に、実際にアミノ酸をコードするエクソン (exon) の部分も削られてしまうことがありうるが、その場合には化学合成したオリゴヌクレオチドのジョイントを用いて削られた部分を修復せると共に、勝り合ったエクソン同志を連結させる。同時に、合成オリゴヌクレオチドを用いた同様な手法により、Fc 領域

遺伝子の3'末端に読みとりフレームを一致させるように翻訳終止コドン (TGA, TAG, TAA) を2つ以上タンデムに連結し、発現効率の向上をはかることができる。ここで得られたインtron のない Fc 領域遺伝子は、やはり合成オリゴヌクレオチドを用いた手法を用い、その上流に読みとりフレームを一致させるように翻訳開始コドンを付与することができる。さらにこの Fc 領域遺伝子は、適当なプロモーター、SD (シャイン・ダルガーノ) 配列の下流につなぐことにより、菌体内発現型遺伝子とすることができます。使用可能なプロモーターとして、トリプトファン・オペロン・プロモーター (trp プロモーター) 、ラクトース・オペロン・プロモーター (lac プロモーター) 、tac プロモーター、P_L プロモーター、I_{rr} プロモーター等かあげられるが、とりわけ trp プロモーターや tac プロモーターが好適である。Fc 領域遺伝子を効率良く発現させるためには、プロモーター、SD 配列、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンのすべてを連結したものが好まし

く、プロモーター、SD 配列、翻訳開始コドン、Fc 領域遺伝子及び翻訳終止コドンが、この順序で連結したものがとりわけ好ましい。

本発明の菌体内発現型ヒト Ig G Fc 領域遺伝子を、適当なプラスミド・ベクター、たとえば pBR322 に挿入することにより、発現型プラスミドが作成できる。菌体内発現型プラスミドとして、好ましくは、pFC203、pFC211、pFC361、pFC362 が用いられる。

《好アルカリ性バチルス No. 170 株ベニシリナーゼ遺伝子のクローニング》

ベニシリナーゼ生産能を有する好アルカリ性バチルス No. 170 株 (FERM BP-467) を適当な条件下、たとえば 30℃で振とう培養し、得られた菌体を遠心分離によって集める。この菌体から、公知の方法、たとえばフェノール法によって DNA を抽出し、染色体 DNA を得る。

こうして得られた DNA を、たとえば E. coli のような制限酵素で部分的に切断し、適当なプラスミドベクター、たとえば pMB9 プラスミド

の E. coli R1 サイトへの挿入を行ない、好アルカリ性バチルス No. 170 株染色体 DNA を組み込んだ組換えプラスミドを得る。この組換えプラスミドを、たとえばエシシリヒア・コリ HB101 株 (ATCC 33894) に公知の方法、たとえば C_aC₂ 法 (M.W.Norgard ら, *Gene*, 3, 279(1978)) を用いて導入、アンピシリン及びテトラサイクリンに耐性の形質転換株をスクリーニングすることにより、好アルカリ性バチルス No. 170 株ベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体内分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域を有する組換えプラスミド、たとえば pEAP1 を得る。

得られた組換えプラスミドの DNA 塩基配列を、たとえば前記マキサム-ギルバート法あるいは前記 M13 ファージを用いたジデオキシ・チューン・ターミネーション法により決定し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域、シグナルペプチド領域、成熟ペプチド領域の構造、さらにベニシリナーゼの菌体内分泌に関与する好アルカリ性バチルス No. 170 株由来の E. coli プロモーター領域及び pM

B 9 プラスミド由来の K I I 遺伝子の構造を明らかにする。第 1 図に、好アルカリ性バチルス No 170 株ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域の DNA 鎮基配列を示す。また、第 2 図にプラスミド F p M B 9 由来の K I I 遺伝子の DNA 鎮基配列を、第 3 図に好アルカリ性バチルス No 170 株由来の E x プロモーター領域の DNA 鎮基配列を、それぞれ示す。さらに、シグナルペプチド領域及び K I I 遺伝子については、対応するアミノ酸配列も合わせて示す。

このベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域を有する組換えプラスミドを出发材料として、自然欠失を利用した方法、あるいは S 1 - ネクレアーゼ、DNA - ポリメラーゼ等の修飾酵素や合成オリゴスクレオチドを用いる人為的方法により、好アルカリ性バチルス No 170 株由来の E x プロモーター領域とプラスミド F p M B 9 由来の K I I 遺伝子から成る菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域全般、及びベニシリナーゼ遺伝子の

全般あるいは一部を含む、組換えプラスミドが得られる。このようなプラスミドとして、好ましくは p E A P 3 、 p E A P 6 、 p E A P 7 、 p E A P 7 Δ H 、 p E A P 7 Δ C C H 、 p E A P 7 Δ C H 、 p E A P 8 、 p 329 E X K が用いられる。

また、上述のベニシリナーゼ遺伝子及びベニシリナーゼの菌体外分泌生産に関与する情報を担う DNA 領域を有する組換えプラスミドを、適当な制限酵素で切断し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む DNA 断片を得る。この DNA 断片を、必要なら適当な合成オリゴスクレオチド・リンクーを介して、適当なプラスミドベクター、たとえば p C M 1 (T. J. Close と R. Rodriguez, Gene, 20, 305 (1982)) と p C M 7 (T. J. Close と R. Rodriguez, Gene, 20, 305 (1982)) とのハイブリッド・プラスミド p C M 7 にクロノン化し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドが得られる。ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するブ

ラスミドとして、好ましくは p P S 1 、 p P S 1 Δ H 、 p 329 P S が用いられる。

(分泌型プラスミドの作成)

前に得られたヒト Ig G - F c 領域菌体内発現型プラスミド、たとえば p P C 362 を、適当な制限酵素で切断することにより、菌体内発現のためのプロモーター領域を削除し、その部分に適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域、たとえば好アルカリ性バチルス No 170 株ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域との連結用の合成オリゴスクレオチド・ジョイントを挿入した形のプラスミドを得る。このようなプラスミドとして、好ましくは p S E C - F C 、 p S E C - F C C が用いられる。

次にこのプラスミドに、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドを適当な制限酵素で切断することにより得られる適当なプロモーター領域を有する DNA 断片及びシグナルペプチド領域を有する DNA 断片を挿入し、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチ

ド領域下流にヒト Ig G - F c 領域遺伝子が連結した形のプラスミドが得られる。このようなプロモーター領域・シグナルペプチド領域を有する遺伝子としては、大腸菌 β - ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファター遺伝子、大腸菌リボプロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロテアーゼ遺伝子、酵母 α 因子遺伝子、好アルカリ性バチルス No 170 株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス (Aeromonas) No 212 株キシラナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルス No N-14 株セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルス No 1139 株セルラーゼ遺伝子等があげられるが、好ましくは好アルカリ性バチルス No 170 株ベニシリナーゼ遺伝子が用いられる。適当なプロモーター領域、適当なシグナルペプチド領域及びヒト Ig G - F c 領域遺伝子が、この順序に連結された形のプラスミドが最も好ましく、このプラスミドを用いることにより、ヒト Ig G - F c 領域蛋白質のベリプラズムまでの分泌が可能になる。このようなベリプラズム分泌発現型プラ

スマドとして、好ましくはpPS-Fcが用いられる。

さらに前記の各種プラスミドを組み合わせることにより、適当なプロモーター領域・シグナルペプチド領域下流にヒトIgG-Fc領域遺伝子を連結したDNA領域、及び好アルカリ性ペチルヌ₁₇₀株由来のE_xプロモーター領域とpMB9プラスミド由来のK_i1遺伝子から成る菌体外分泌産生に関与する情報を担うDNA領域とを合わせ持つようなプラスミドが得られる。このプラスミドを用いることにより、ヒトIgG-Fc領域蛋白質の菌体外分泌が可能になる。このような菌体外分泌発現型プラスミドとして、好ましくはpEXFC10、pEXFC100が用いられる。

なお、本発明において適当なプロモーター領域、シグナルペプチド領域、ヒトIgG-Fc領域遺伝子、E_xプロモーター領域及びK_i1遺伝子は、これらと生物学的機能において同等なDNA領域、すなわち該DNA領域に対してスクレオチドの置換、スクレオチドの欠失、スクレオチドの挿入及

びスクレオチド配列の逆位その他の突然変異によって関連づけられているDNA領域でもよいことはいうまでもない。

(ヒト免疫グロブリンG-Fc領域蛋白質の生産)

かくして得られた、ヒトIgG-Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミド、ベリプラズム分泌発現型プラスミド及び菌体外分泌型プラスミドを常法により適当な宿主に導入して組換え微生物を得、これを培養することにより、ヒトIgG-Fc領域蛋白質を生産させることができる。このような宿主としてはエシレリヒア(*Escherichia*)属に属する微生物を有利に使用することができる。宿主としては、前記のエシレリヒア・コリH101株、同C600株、同DP-supF株、同X1776株、同LE392株等、通常のこの種の技術分野で用いられる微生物が有利に用いられる。なかでも、エシレリヒア・コリH101株及び同C600株がとりわけ好ましい。

このようにして得られた組換え微生物を、それ自体は公知の方法で培養する。培地としては、ヒ

トIgG-Fc領域蛋白質の生産に適した培地であって、かつ宿主微生物の生育に適した培地を用い得るが、たとえばM9培地(*T. Maniatis*ら編、*Molecular Cloning P440*(*Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982*))、LB培地(*T. Maniatis*ら編、*Molecular Cloning, P440*(*Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982*))、BPP培地(Difco製)、Nutrient寒天培地等を基本培地として調製したものを用いればよい。その他、必要に応じて、炭素源無炭素源の他にアミノ酸、ビタミン等の栄養素を添加してもよいし、発現型プラスミドの宿主内安定化のために適当量の抗生物質等を添加してもよい。

培養は、pH、温度、酸素供給量を目的の組換え微生物に適した条件で行なう。菌体内発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、プロモーターを効率良く機能させる目的で、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド等の薬剤を加えることもできる。菌体外分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、該微

生物が生育してその菌体量が最大に達したとき、即ち対数増殖後期から培地中にFc領域蛋白質が生成、蓄積するまでの時間中、同一培地で培養をそのまま継続するのがよい。たとえばエシレリヒア属の微生物の前記菌体量が最大に達したときから培地中にFc領域蛋白質の生成、蓄積が停止するまでの時間は、ほぼ12~48時間の範囲である。なお、pH条件は特に影響されないが、pH5~8の範囲、特にpH7が適当である。また、ベリプラズム分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養についても、菌体外分泌型プラスミドを有する組換え微生物と同様な方法で行なうことができる。

培養後、たとえばオスモティック・ショック法(*C. Kato*ら、*E. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 339(1983))を用いて、培養物を菌体内画分、ベリプラズム画分及び菌体外画分に分画する。各画分におけるヒトIgG-Fc領域蛋白質の有無は、たとえば市販のウサギ抗ヒトIgG-Fc成分抗血清及び酵素標識抗ウサギIgG抗体を用いた

エンザイム・イムノアツセイ (EIA) により確認できる。

本発明において、アミノ酸、ペプチド、核酸、その他に関し略号で表示する場合、それらは I U P A C - I U B 生化学命名委員会 (CBN) による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づいて表示され、例えば下記の略号が使用される。なお、アミノ酸などに關し光学異性体がある得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。

Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸
Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニールアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン

Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン
Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : リオシン
Ile : イソロイシン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
DNA : デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
以下実施例を掲げて本発明について詳細に説明するが、本発明は何らこれにより限定されるものではない。

実施例 1 (ヒト染色体DNAの単離)

ヒト骨髄細胞 A R H 77株 3×10^8 個をガラス棒でつぶし、2% SDS存在下、プロテアーゼK (シグマ) で処理した後、TEバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) で飼和したフェノールを加えた。遠心分離により水相とフェノール相を分離し (フェノール抽出)、水相をTEバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、5 mM EDTA) に対して透析した。リボヌクレアーゼA (シグマ) 処理をし、再度フェノール抽出を行なった後、TEバッファーに対して透析し、ヒト染色体DNA約1.2mgを取得した。(N. Blinら、Nucleic Acids Res., 3, 2303(1976) 参照)。

実施例 2 (ヒト遺伝子ライブラリーの作成)

実施例1で得られたヒト染色体DNA150 μ gを後述する実施例4に示した方法に準じて制限酵素EcoRI (宝酒造) で部分分解した後、蔗糖密度勾配法 (蔗糖10~40% (wt/vol)、28000

rpm \times 15時間、20°C) を行ない、15Kbp~23Kbpに相当するDNA断片4.3 μ gを得た。次にこのDNA断片0.8 μ gとシャロン4Aベクターとの連結を行い、シャロン4Aベクターの右のアームと左のアームの間にヒト由来のDNAが挿入されたハイブリッドDNAを得た。連結にはT4-DNAリガーゼ (ペセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ) を用い、連結反応は66mM Tris-HCl (pH 7.6)~6.6 mM MgCl₂~10mMジチオスレイトール~1mM ATP水溶液中で、11°C、12時間行なった。得られたハイブリッドDNAについて、イン・ビトロ・パッケージングを行ない、ヒト遺伝子ライブラリー (1.8×10^6 PFU/ μ g、ヒト染色体DNAの99%以上を含む)とした。

実施例 3 (ヒト免疫グロブリンG遺伝子のスクリーニング)

前記実施例2で得られたヒト由来のDNAを含むシャロン4Aファージの集合 (遺伝子ライブラリー) をエシレヒニア・コリ L B 392株に感染さ

せ、ブラークを形成させた。ヒト抗体遺伝子を含むクローニンは、ブラーク・ハイブリダイゼーション法により、³²P】-標識ヒト免疫グロブリンG H鎖J遺伝子で選択した。ヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン4 A ファージからのDNAの調製は、Thomasらの方法 (H.Thomasら, J.Mol.Biol., 91, 315(1974) 参照) により行なった。

実施例4 (制限酵素切削地図の作成)

実施例3で得られたヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン4 A DNA 1 μg を制限酵素切削用バッファー (Eco RI, Hpa I, Hind I, Taq I, Xba I, Xho I 切断では50 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 100 mM NaCl - 10 mM MgSO₄ 水溶液、Acc II, Bam HI, Cfa I, Hind III, Pst I, Rsa I, Sau 3 A I 切断では10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 60 mM NaCl - 7 mM MgCl₂ 水溶液を、Bai I, Bst N I, Nae I, Sst II 切断では10 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 10 mM MgSO₄ -

1 mM チオスレイトール水溶液、そして Smal 切断では10 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 20 mM KCl - 7 mM MgCl₂ - 7 mM 2-メルカブトエタノール水溶液、それぞれ用いた。) 20 μl に溶解させ、制限酵素 (Bst N I, Cfa I, Nae I はニュー・イシグランド・バイオラブズ製、Sst II はベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ製、Rsa I, Sau 3 A I, Taq I はニッポン・ジーン製、それ以外は宝塚造製を用いた。) 2 ~ 4 ユニットを添加して、37°C、1 時間以上切断を行なった。制限酵素 Bst N I 及び Taq I による切断は、60°C で 1 時間以上切断を行なった。なお、二種類の制限酵素による切断を行なう場合には、まず低塩濃度で作用する制限酵素で処理し、次に所定濃度まで塩濃度を上げてから、より高塩濃度で作用する制限酵素で処理した。

制限酵素による切断後、4 μl の0.25% プロモフェノールブルー-50% グリセロール水溶液を加え、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8% ~

2.5%) を行なった。アガロースはシグマ社のタイプII電気泳動用を使用した。電気泳動バッファーとして、40 mM Tris-CH₃COOH (pH 8.0) - 1 mM EDTA 水溶液を用いた。厚さ 2 mm の垂直ゲルにて、6 ~ 9 V/cm の電圧で 1.5 ~ 3 時間電気泳動を行なった。この電気泳動の際、DNA断片の分子量マーカーとして、メファージのDNAを制限酵素 Hind III で切削したもの (ベーリンガー・マンハイム) を用いた。電気泳動終了後、アガロースゲル中のDNAを2 μg/mℓエチジウムプロマイド水溶液で染色し、このゲルに対して長波長紫外線を照射して、切断パターンの観察を行なった。各種制限酵素単独による切削、及び二種の制限酵素の組合せによる切削、これらの切削パターンを解析することにより、第4図(A)に示すような核酸制限酵素切削点の相対位置関係を決定した。第4図(A)は Ig G 遺伝子を含むヒト染色体DNAの制限酵素切削点地図を示す。

実施例5 (ヒト免疫グロブリンG遺伝子断片のサ

ブクローニング)

ヒト Ig G 遺伝子を含むシャロン4 A DNA 3 μg を実施例4の方法に準じて制限酵素 Hind III で切削し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) を行なった。ヒト Ig G Fc 領域遺伝子を含む約8.2 KbpのDNAの部分に相当するバンドを切出し、そのアガロースゲル断片を3倍量 (vol/wt) の8 M NaClO₄ 水溶液に溶解させた。Chenらのグラスフィルター法 (C.W.Chenら, Anal.Biochem., 101, 339(1980)) により、約8.2 KbpのDNA断片をアガロースゲルにより回収した。一方、大腸菌用プラスミド pBR322 1 μg を実施例4に準じて制限酵素 Hind III で切削したものに対して、アルカリ性ホスファターゼ (E.coli C75) (宝塚造) を0.5 ユニット加えて、37°C で 1 時間反応させた。反応終了後、反応液中のアルカリ性ホスファターゼを失活・除去するため、フェノール抽出を3回繰り返した。このようにして得られた pBR322 の Hind III-アルカリ性ホスファターゼ処理液を、ゲルより回収した約

8.2 Kbp Hind III 断片水溶液と混ぜ、エタノール沈殿の後、連結反応用バッファー（実施例2を参照）50μl に溶解させる。2ユニットのT4-DNAリガーゼを加え、11℃、12時間反応させて、連結反応を行なった。

エシリヒニア・コリ C600 株 (ATCC 3352-5) の形質転換は、通常の Ca C₂ 法 (M.V. Negev らの方法、前記) の改良法で行なった。すなわち、5mM の L 培地 (1% トリプトン、0.5% 脱脂エキス、0.5% NaCl、pH 7.2) に大腸菌 C600 株の18時間培養液を接種し、菌体を含む培養液の600mM における濁度 (OD₆₀₀) 0.3 まで生育させる。菌体を冷たいマグネシウム・バッファー (0.1M NaCl、5mM MgCl₂、5mM Tris-HCl (pH 7.6、0℃)) 中で2回洗い、2mM の冷やしたカルシウム・バッファー (100mM CaCl₂、250mM KCl、5mM MgCl₂、5mM Tris-HCl (pH 7.6、0℃)) 中に再懸滴させ、0℃で25分間放置する。次に菌体をこの容

量の1/10にカルシウム・バッファーの中で混ぜし、連結後の DNA 水溶液と 2:1 (vol.:vol.) 混合する。この混合物を60分間、0℃で保った後、1mM の L B G 培地 (1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl、0.08% グルコース、pH 7.2) を添加し、37℃で1時間振とう培養する。培養液を、選択培地 (アンビシリン30μg/mM を含む L 培地ブレート) に100μl/ブレートの割合で接種する。ブレートを37℃で1晩培養して、形質転換株を生育させる。得られたアンビシリン耐性のコロニーより、公知の方法を用いて DNA を調製し、アガロースゲル電気泳動により、目的のサブクローン pTJ1B (約12.6Kbp) を確認した。

前記実施例4の方法により作成した、このサブクローンの制限酵素切断点地図を第4図 (B) に示した。この第4図 (B) において Pst I (2) から Hind III (1) の間に、Pst I サイトが3~4個存在することは確認したが、その位置についての確認は行なっていない。

さらに、前記プラスミド pTJ1B の Pst I (2) → Pst I (1) の DNA 断片 (約 1.7Kbp) を、pTJ1B の場合とほぼ同様の手法により、プラスミド pBR322 の Pst I サイトに導入し、プラスミド pTJ5 (約 6.1Kbp) を作成した。目的のクローンは、テトラサイクリン耐性の形質転換株の中から選択した。得られたサブクローンの制限酵素切断点地図を、第4図 (C) に示した。

実施例6 (ヒト免疫グロブリン G-Fc 領域遺伝子 DNA 基配列の決定)

ヒト IgG-Fc 領域遺伝子の DNA 基配列は、マキサム・ギルバート法により決定した。

たとえば、前記実施例5において作成されたサブクローン pTJ5 DNA 約50μg を実施例4の方法に準じて Sma I で切断する。得られた DNA 断片をアルカリ性ホスファターゼで脱ホスホリ化し、ポリスクリオチドキナーゼ (P-L バイオケミカルズ) 5ユニットを用いて (r-³²P) - ATP で標識した。ポリスクリオチドキナ

ーゼ反応は 50mM Tris-HCl (pH 9.5) - 10mM MgCl₂ - 5mM ジチオスレイトール水溶液中で行ない (r-³²P) - ATP はアマーチャム製を 100 μCi 分用いた。³²P 標識 DNA 断片を Pst I で切断した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5%) により目的の DNA 断片を分離し、後述の実施例7の方法に従ってゲルからの抽出を行なった。得られた³²P 標識 Sma I → Pst I 断片について、各塩基特異的な部分分解反応を行ない、7M 尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 8%~23%) で分離した。2~7日間、-80℃でオートラジオグラフィーを行なった後、分解パターンの解析を行ない、Fc 領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

一方、pTJ5 を Pst I で切断した場合には、3' 末端標識キット (アマーチャム) を用いて、(r-³²P) - d dATP による標識を行なった。この³²P 標識 DNA 断片を Sma I で切断した後、目的の DNA 断片のポリアクリルアミドゲル電気

泳動（ゲル濃度5%）による分離・回収を行なった。得られた³²P標識-PstI \longrightarrow SmaI断片についても、上記手順に従って解析を行ない、Fc領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

実施例7 (Fc領域C_u 3部位遺伝子のクローニング)

実施例5で得られたプラスミドpTJ5を、実施例4の方法に準じて制限酵素PstIを切断した後、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度0.8%）を行ない、Fc領域遺伝子を含む約1.7KbpのDNA断片を実施例5の方法でゲルより回収した。得られたDNA断片を、実施例4の方法で制限酵素NaeIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）を行なった。C_u 3部位遺伝子を含む約0.6KbpのDNAの部分に相当するバンドを切斷し、そのポリアクリルアミドゲル断片を細かく破砕した後、2~5mLの溶出用バッファー〔500mM NH₄OAc, 1mM EDTA, 0.1% SDS (pH7.5)〕を加え、

37°Cで一晩振とうした。遠心分離により、目的のDNAを含む水相の回収を行なった。さらに行なれたDNA断片を、実施例4の方法で制限酵素RsaIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）の後、C_u 3部位を含む約310bpのDNA断片を、上記と同様な方法により、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

こうして得られたC_u 3部位遺伝子を含む約310bpのRsaI \longrightarrow NaeIのDNA断片を、実施例5の方法に準じてプラスミドpBR322のBamIサイトに挿入し、C_u 3部位遺伝子の読みとり方向がプラスミドpBR322中のテトラサイクリン耐性遺伝子の読みとり方向と一致する方向（第5図において時計まわりの方向）に挿入されたプラスミドpFC70（約4.7Kbp）を作成した。pFC70作成の方法を第5図に示した。

実施例8 (Fc領域C_u 2部位遺伝子とC_u 3部

位遺伝子の連結)

実施例7で得られた、Fc領域遺伝子を含む約1.7KbpのDNA断片を、実施例4の方法に準じ

て制限酵素Sau3A I及びTaqIで切斷し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）の後、C_u 2部位遺伝子を含む約240bpのDNA断片約0.5μgを、実施例7の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

C_u 2部位とC_u 3部位の連結部分に相当する、第6図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴスクレオチドを、上の鎖と下の鎖とに分けて化学合成した。オリゴスクレオチドの合成は全自動DNA合成機（アプライド・バイオシステムズ、モデル380A）を用いて、ホスフォアミダイト法により行なった。合成オリゴスクレオチドの精製は、アプライド・バイオシステムズ社のマニュアルに準じて行なった。すなわち、合成オリゴスクレオチドを含むアンモニア水溶液を55°Cで一晩保つことにより、DNA塩基の保護基をはずし、セファデックスG-50ファイン・ゲル（ファルマシア）を用いたゲル通過によって、高分子量の合成オリゴスクレオチド画分を分取する。ついで、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃

度20%）の後、紫外線シャドウイング法により泳動パターンの観察を行ない、目的とする大きさのバンド部分を切出して、実施例7の方法に準じて合成オリゴスクレオチドをポリアクリルアミドゲルより回収した。最後に合成オリゴスクレオチドを含む溶液をゲル通過カラム（セファデックスG-50）にかけることにより、合成オリゴスクレオチドの精製品を得た。なお、必要に応じて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を繰り返し、合成オリゴスクレオチドの純度の向上をはかった。このようにして得られた合成オリゴスクレオチド精製物0.1~1.0μgを、実施例6の方法に準じて、1mM ATP存在下でポリスクレオチドキナーゼ反応を行ない、5'末端側をリン酸化する。5'末端をリン酸化した、上の鎖と下の鎖に相当する2本の合成オリゴスクレオチドを混合し、その水溶液温度を70°Cから室温まで徐々に冷却することにより、アニーリングを行なった。以上のようにして、C_u 2部位とC_u 3部位との連結部分に相当するTaqI \longrightarrow SmaIのDNA断片（約

68bp) を取得した。

一方、前記実施例 7 で作成したプラスミド p F C70 DNA 約 5 μg を、実施例 4 記載の制限酵素 Sma I 切断用バッファーに溶解し、2~5 ユニットの Sma I を加えて 20°C で 15~45 分反応させて部分分解を行なう。フェノール抽出により Sma I を失活させた後、実施例 4 の方法に準じて、制限酵素 Bam HI による切断を行なう。アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、C₆ 3 部位遺伝子とベクターの大部分を含む第 6 図記載の Bam HI → Sma I -(I) の DNA 断片 (約 3.6 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C₆ 2 部位遺伝子を含む Sau 3 A I → Taq I の DNA 断片、C₆ 2 部位と C₆ 3 部位の連結部分に相当する Taq I → Sma I の DNA 断片、そして C₆ 3 部位とベクター部分を含む Bam HI (Sau 3 A I) → Sma I -(I) の DNA 断片を混合し、実施例 5 の方法に準じて、C₆ 2 部位遺伝子と C

片を、実施例 7 の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

さらに、プロモーターと Fc 領域遺伝子との連結部分に相当する、第 7 図記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴスクレオチド (約 39bp) を、実施例 8 の方法に準じて作成した。この C₆ 2 A I → Bst N I -(I) の DNA 断片中には、trp プロモーターとの連結のための制限酵素 C₆ 2 A I サイト、ATG という塩基配列で表わされる翻訳開始コドン、h 部位遺伝子及び C₆ 2 部位遺伝子の一部が連結して含まれており、この DNA 断片を用いることにより、イントロンのない Fc 領域 (h - C₆ 2 - C₆ 3 部位) 遺伝子をトリプトファン・オペロン・SD 配列下流に適当な距離をへだてて連結することが可能になった。

一方、trp プロモーターを含むプラスミド p Y S31N (約 4.7 Kbp) を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Pst I 及び C₆ 2 A I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、trp プロモーター及びベクターの一部を含む。

C₆ 3 部位遺伝子がイントロンを介さずに連結された遺伝子を含むプラスミド p F C77 (約 3.9 Kbp) を作成した。第 6 図に p F C77 の作成方法を示した。

実施例 9 (Fc 領域遺伝子と trp プロモーターとの連結)

実施例 8 で得られたプラスミド p F C77 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Sst II 及び Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8 %) の後、C₆ 2 部位遺伝子の後半部分、C₆ 3 部位遺伝子全域及びベクターの一部を含む、第 7 図記載の Sst II → Pst I の DNA 断片 (約 2.7 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

次に、実施例 7 で得られた Fc 領域遺伝子を含む約 1.7 Kbp の DNA 断片を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 Bst N I 及び Sst II で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5 %) の後、C₆ 2 部位遺伝子の前半部分を含む約 171bp の Bst N I -(I) → Sst II の DNA 断

第 7 図記載の Pst I → C₆ 2 A I の DNA 断片 (約 1.1 Kbp) を、実施例 5 の方法によりアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C₆ 2 部位後半と C₆ 3 部位遺伝子とベクターの一部を含む Sst II → Pst I の DNA 断片、C₆ 2 部位遺伝子前半部分を含む Bst N I -(I) → Sst II の DNA 断片、プロモーターと Fc 領域遺伝子との連結部分に相当する C₆ 2 A I → Bst N I -(I) の DNA 断片、そして trp プロモーターとベクターの一部を含む Pst I → C₆ 2 A I の DNA 断片を混合し、実施例 5 の方法に準じて、Fc 領域 (h - C₆ 2 - C₆ 3 部位) 遺伝子発現型プラスミド p F C203 (約 4.0 Kbp) を作成した。第 7 図に p F C203 の作成方法を示した。

実施例 10 (Fc 領域遺伝子翻訳終止コドンのタンデム化)

実施例 9 で得られた Fc 領域遺伝子発現型プラスミド p F C203 を、実施例 8 に記載の方法に準じて、制限酵素 Sma I で部分分解した後、制限

酵素 Pst I による完全分解を行なう。アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、F c 領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含む第8回記載の Sma I - (2) → Pst I のDNA断片 (約1.8 Kbp) を、実施例5の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

また、C_{II} 3部位遺伝子後部と翻訳終止コドンに相当する、第8回記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチド (約17bp) を、実施例8の方法に準じて作成した。この Sma I - (2) → Bam H I のDNA断片には、C_{II} 3部位遺伝子の一部、T A A T A G という塩基配列で表わされるタンデム化翻訳終止コドン及びベクターとの連結のための制限酵素 B a m H I サイトが含まれており、このDNA断片を用いることにより F c 領域遺伝子の翻訳終止コドンのタンデム化が可能になつた。

一方、プラスミド p B R 322 を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Pst I 及び B a m H I で切断、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%)

の後、ベクターの大部分を含む、第8回記載の B a m H I → Pst I のDNA断片 (約3.2 Kbp) を、実施例5の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、F c 領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含む Sma I - (2) → Pst I のDNA断片、C_{II} 3部位遺伝子後部とタンデム化翻訳終止コドンを含む Sma I - (2) → B a m H I のDNA断片、そしてベクターの大部分を含む B a m H I → Pst I のDNA断片を混合し、実施例5の方法に準じて、タンデム化翻訳終止コドンを有する F c 領域遺伝子発現型プラスミド p F C 211 (約5.0 Kbp) を作成した。第8回に p F C 211 の作成方法を示した。

実施例11 (F c 領域遺伝子と tac プロモーターとの連結)

実施例9で得られた F c 領域遺伝子発現型プラスミド p F C 203 を、実施例4の方法に準じて制限酵素 C_{II} 3 I で切断し、ポリメラーゼ用バッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.2)、10

mM MgSO₄、0.1mM ジチオスレイトール、50μg/ml ウシ血管アルブミン) 40μl に溶解し、0.25mM d G T P 及び0.25mM の d C T P 存在下で、2ユニットのDNAポリメラーゼ I・ラージ・フラグメント (ベセグ・リサーチ・ラボラトリーズ) を加える。37℃で30分間反応させて、末端の平滑化をはかる。次にこのDNA断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、F c 領域遺伝子全域とベクターの大部分を含む、第9回記載の約2.8 KbpのDNA断片を、アガロースゲルより回収した。

次に、tac プロモーターを含むプラスミド p D R 540 (約4.0 Kbp、ファルマシア) DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素 B a m H I で切断し、ついで上記の方法に準じて、d G T P、d A T P、d T T P、d C T P 存在下、DNAポリメラーゼ I・ラージ・フラグメント処理により、末端の平滑化を行なう。次にこのDNA断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素 Pst I で切断

し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、tac プロモーターとベクターの一部を含む、第9回記載の約1.1 KbpのDNA断片を、アガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、F c 領域遺伝子全域とベクターの大部分を含む約2.8 KbpのDNA断片と、tac プロモーターとベクターの一部を含む約1.1 KbpのDNAとを混合し、実施例5の方法に準じて、tac プロモーターの下流に F c 領域遺伝子が連結した形の発現型プラスミド p F C 361 (約3.9 Kbp) を作成した。第9回に p F C 361 の作成方法を示した。

上記により得られた F c 領域遺伝子発現型プラスミド p F C 361 DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素 Sst II 及び Pst I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度0.8%) の後、ベクターの一部、tac プロモーター及び F c 領域遺伝子前半部分を含む、第9回記載の Sst II → Pst I のDNA断片 (約1.3 Kbp) を、実施例5の方法によりアガロースゲルより回収した。

また、実施例10により得られたタンデム化翻訳

終止コドンを有する Pc 領域遺伝子発現型プラスミド pFC211 DNA を、実施例4の方法に準じて制限酵素 SstII 及び PstI で切断した後、上記と同じ手法により、 Pc 領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含む、第9図記載の $\text{PstI} \longrightarrow \text{SstII}$ の DNA 断片（約3.6 Kb p）を得た。

かくして得られた、ベクターの一部、 lacZ プロモーター及び Pc 領域遺伝子前半部分を含む $\text{SstII} \longrightarrow \text{PstI}$ の DNA 断片と、 Pc 領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含む $\text{PstI} \longrightarrow \text{SstII}$ の DNA 断片とを混合し、実施例5の方法に準じて、 lacZ プロモーターの下流に Pc 領域遺伝子が連結され、なおかつタンデム化翻訳終止コドンを有する形の発現型プラスミド pFC362 （約4.9 Kb p）を作成した。第9図に pFC362 の作成方法を示した。

実施例12（好アルカリ性バチルス No.170 株染色体

前者と混合し、実施例2の方法に従って T4-DNA リガーゼによって10℃、24時間DNA鎖の連結反応を行ない、65℃、5分の然処理後、反応液に2倍容のエタノールを加えて染色体DNAを組み込んだプラスミドDNAを沈殿、採取した。

実施例14（好アルカリ性バチルス No.170 株ベニシリナーゼ遺伝子のクローニング）

実施例13で得られた好アルカリ性バチルス No.170 株染色体DNAを有するプラスミドを、通常の CacCE2 法（H.V.Norgard らの方法、前記）により、エシェリヒア・コリ H101 株に導入した。これらの形質転換株の中からアンビシリソングリセラーゼ遺伝子を有するクローニングした。この宿主を培養した後第10図のように処理することにより、ベニシリナーゼ遺伝子を含む4.5 Kb pの挿入を有する組換えプラスミド pEAP1 が得られた。さらに、実施例4の方法に準じて制限酵素切断点地図を作成した。第11図に pEAP1 の制限酵素切

DNAの調型)

ベニシリナーゼを菌体外に生成、蓄積する能力を有する好アルカリ性のバチルス No.170 株（PE RM-BP-467）を培地（（g/l）：グリセロール 2.0、酵母エキス 5.0、ボリペプトン 5.0、 K_2HPO_4 1.0、 MgSO_4 0.7 HzO 0.2 を NaHCO_3 10で pH 9.0に調整したもの）中、30℃で15時間振盪培養を行ない、対数増殖後期の菌体を集菌後、フェノール法によるDNA抽出法によって染色体DNAを抽出、精製し、染色体DNA 5 mgを得た。

実施例13（好アルカリ性バチルス No.170 株染色体 DNA 断片のベクターへの挿入）

実施例12で得られた染色体DNA 10 μg をとり、実施例4の方法に準じて、制限酵素 EcoRI を加え、37℃で反応させて部分的に切断した。一方、ベクターとして用いるテトラサイクリン抵抗性（ TetR ）の pMB9 プラスミドDNA（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ）を制限酵素 EcoRI で完全に切断して65℃、5分の然処理後、

断点地図を示す。

実施例15（好アルカリ性バチルス No.170 株染色体DNAを有するプラスミドのDNA塩基配列の決定）

好アルカリ性バチルス No.170 株の染色体DNAを含むプラスミドのDNA塩基配列の決定は、M13シーケンシング・キット（アマーシャム）を用い、M13ファージによるジオキシ・チーン・タミネーション法により行なった。第1図に好アルカリ性バチルス No.170 株ベニシリナーゼ遺伝子プラスミド領域・シグナル領域のDNA塩基配列を、第2図にプラスミド pMB9 由来の $\text{K}i$ 遺伝子のDNA塩基配列を、そして第3図に好アルカリ性バチルス No.170 株染色体DNA由来の $\text{E} \times \text{プロモーター}$ のDNA塩基配列を、それぞれ示した。

実施例16（好アルカリ性バチルス No.170 株染色体DNAを有する各種プラスミド誘導体の作成）

前記実施例14で得られたエシェリヒア・コリ H

B101(pEAP1) 株を継代していく中で、ベニシリナーゼ活性の増強 (pEAP1 の約 3 倍) された変異体 (アンビシリソ耐性 (Ap^r) 、テトラサイクリン感受性 (Tet^s)) を得た。この変異株から第10回の方法によりプラスミドを調製したところ、ベニシリナーゼの構造遺伝子の上流約 4 Kbp が脱落したプラスミド pEAP3 (約 5.8 Kbp) が得られた。第12回に pEAP3 の制限酵素切断点地図を示す。

こうして得られた pEAP3 プラスミド 1 μg を実施例4の方法に準じて制限酵素 EcoRI と HindIII を加えて、37°C、2 時間反応させて切断した。次に実施例11の方法に準じて DNA ポリメラーゼ I ラージ・フラグメントを加えて、室温で 30 分間反応させ、DNA 切断面を平滑末端とし、ついで、実施例2の方法に準じて T4-DNA リガーゼによって、室温、24 時間 DNA 領の連結反応を行い、65°C、5 分間の熱処理後、反応液に 2 倍容のエタノールを加えてプラスミド DNA を沈殿、採取した。得られたプラスミド DNA を実施

例14と同様にエシェリヒア・コリ H101 株に導入形質転換し、アンビシリソ耐性形質転換株から第10回の方法によりプラスミドを分離精製し、約 1.0 Kbp の EcoRI → HindIII DNA 断片の脱落したプラスミド pEAP6 (約 4.8 Kbp) を得た。第12回に pEAP6 の作成方法を示した。次に、プラスミド pBR329 (約 4.15 Kbp) (L. Covarrubias ら, *Gene*, 17, 79 (1982)) DNA 10 μg を、実施例4の方法に準じて制限酵素 AccII で切断した後、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 1.5%) を行ない、エレクトロアリューション (P.J. Greene ら, "Methods in Molecular Biology" vol.7, Marcel Dekker, 1974, p.87) を用いて、クロラムフェニコールアセチルトランスクレーバー (CAT) 遺伝子を含む AccII → AccII の DNA 断片 (1.3 Kbp) を回収した。また先に得られたプラスミド pEAP6 を実施例4の方法に準じて制限酵素 SmaI で切断して後、上記の AccII → AccII の DNA 断片と混合し、実施例2の方法に準じて T4-DNA リガーゼを用いて連結反応を行ない、上記と同様にしてエシェリヒア・コリ H101 株に導入形質転換し、クロラムフェニコール耐性・アンビシリソ感受性の形質転換株からプラスミドを分離精製し、プラスミド pEAP7 (約 6.1 Kbp) を作成した。第12回に pEAP7 の作成方法を示した。

こうして得られたプラスミド pEAP7 を実施例4の方法に準じて制限酵素 HindIII で切断し、実施例11の方法に準じて DNA ポリメラーゼ I ラージ・フラグメントにより末端を平滑化した。実施例2の方法に準じて T4-DNA リガーゼを用いて自己連結反応を行ない、上記と同様にして、プラスミド pEAP7 の HindIII サイトを欠失させた形のプラスミド pEAP7ΔH (約 6.1 Kbp) を作成した。第13回に pEAP7ΔH の作成方法を示す。

さらにプラスミド pEAP7ΔH を、実施例4の方法に準じて制限酵素 CbaI で切断し、実施

例11の方法に準じて DNA ポリメラーゼ I ラージ・フラグメントにより末端を平滑化する。実施例2の方法に準じて T4-DNA リガーゼを用いて連結反応を行ない、上記と同様にしてエシェリヒア・コリ H101 株に導入形質転換し、クロラムフェニコール耐性・アンビシリソ感受性の形質転換株からプラスミドを分離精製し、プラスミド pEAP7ΔCCH (約 6.1 Kbp) を作成した。第13回に pEAP7ΔCCH の作成方法を示す。

得られたプラスミド pEAP7ΔCCH を、実施例4の方法に準じて制限酵素 HindIII で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) の後、ベニシリナーゼ遺伝子 (一部欠失) を含まない約 3.8 Kbp の HindIII → HindIII の DNA 断片をエレクトロアリューション法により回収する。一方、上述のプラスミド pEAP7 と同様にして制限酵素 HindIII 切断、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) を行ない、ベニシリ

ナーゼ遺伝子を含む約2.3 KbpのHinc II → Hinc IIのDNA断片を回収する。これら2種のDNA断片を、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結し、上記と同様にしてエシリヒア・コリHB101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール及びアンピシリンに耐性の形質転換株の中からプラスミドを分離精製し、プラスミドpEAP7ΔCH(約6.1 Kbp)を作成した。第13図にpEAP7ΔCHの作成方法を示す。

こうして得られたプラスミドpEAP7ΔCHを、実施例4の方法に準じて制限酵素Hpa Iで切断した後、末端をリノ酸化したSae Iリノカ- (宝酒造)と混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結反応を行なう。エタノール沈殿の後、実施例4の方法に準じて制限酵素Cla I及びSae Iで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子後半部、E_xプロモーター領域及びベクターの大部分を含む4.5 KbpのCla I

→ Sae IのDNA断片をエレクトロエリューション法により回収する。一方、後述の実施例15で得られたプラスミドp329PSを同様にして制限酵素Cla I及びSae Iで切断、ポリアクリルアルミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む約200bpのSae I → Cla IのDNA断片をエレクトロエリューション法により回収する。こうして得られた2種のDNA断片を混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼで連結後、上記と同様にしてエシリヒア・コリHB101株に導入形質転換し、クロラムフェニコール耐性の形質転換株の中からプラスミドを分離精製し、分認プラスミドベクター-pEAP8(4.7 Kbp)を作成した。第14図にpEAP8の作成方法を示す。

先に作成したプラスミドpEAP8を実施例4の方法に準じて制限酵素Hinc Iで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、好アルカリ性バチルスNo170株染色体DNA由来

E_xプロモーター領域とプラスミドpMB9由来K₁I₁遺伝子から成る複合外分認産生に関与する領域を含む約0.95 KbpのHinc I → Hinc IのDNA断片を、エレクトロエリューション法により回収する。このDNA断片について、実施例11の方法に準じてDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメントを用いた末端の平滑化を行ない、実施例2の方法に準じて末端をリノ酸化したEco RIリノカ- (宝酒造)とT4-DNAリガーゼによって連結する。エタノール沈殿の後、実施例4の方法に準じて制限酵素Eco RIで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)・エレクトロエリューション法によって末端にEco RIサイトを有するEco RI → Eco RIのDNA断片(約0.95 Kbp)を回収する。次に、プラスミドpBR329を、実施例4の方法に準じて制限酵素Eco RIで切断し、上記約0.95 KbpのEco RI → Eco RIのDNA断片と混合、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼによる連結反応を行なった。上記と同様にエシリ

ヒア・コリHB101株に導入形質転換し、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性の形質転換株よりプラスミドを分離精製し、多コピー型分認プラスミドベクター-p329EXK(約5.1 Kbp)を作成した。第15図にp329EXKの作成方法を示す。実施例17(好アルカリ性菌ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を有するプラスミドの作成)

CAT遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM1(約4.1 Kbpファルマシア)を実施例4の方法に準じて制限酵素Eco RI及びSae Iで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、実施例15の方法に準じて約0.5bpのCAT遺伝子の後半部分を含むEco RI → Sae IのDNA断片を回収する。さらに、CAT遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM7(約4.1 Kbp、ファルマシア)を上記と同様にして、制限酵素Eco RI及びSae Iで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、CAT遺伝子前半部分とベクターの大部分から成る約3.1 KbpのEco

o R I \longrightarrow S a $\&$ I の DNA 断片を回収する。これらの DNA 断片を混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼで連結し、実施例 16 の方法に準じて C A T 遺伝子誘導体を含む新規プラスミド p C M 71 (約 3.6 Kbp) を作成した。第 16 図に p C M 71 の作成方法を示す。

前記実施例 16 で得られたプラスミド p E A P 3 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 R s a I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5%) 後、実施例 16 の方法に準じてベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナル領域を含む R s a I \longrightarrow R s a I の DNA 断片 (約 200b p) を回収する。この R s a I \longrightarrow R s a I の DNA 断片を末端をリン酸化した H i n d I I リンカー (宝酒造) と混合、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結した後、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d I I で切断する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5%) の後、実施例 15 の方法に準じて末端が H i n d I I サイトに変換されたベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナル領域を含む H i n d I I \longrightarrow H i n d I I の DNA 断片 (約 3.7 Kbp) を回収する。この H i n d I I \longrightarrow H i n d I I の DNA 断片を実施例 11 の方法に準じて DNA ポリメラーゼ I・ラージ・フラグメントを用いて末端を平滑化した後、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼによって自己閉環させる。このようにして上記方法に準じて、プラスミド p P S 1 中のベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域上流に存在する H i n d I I サイトを欠失させた形のプラスミド p P S 1 Δ H (約 3.7 Kbp) をを作成した。第 18 図に p P S 1 Δ H の作成方法を示す。

さらにプラスミド p P S 1 Δ H を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 C $\&$ a I で切断した後、末端をリン酸化した S a $\&$ I リンカー (宝酒造) と混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結反応を行なう。エタノール沈澱の後、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d I I 及び S a $\&$ I で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 5%) を行ない、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む H i n d I I \longrightarrow H i n d I I の DNA 断片 (約 210bp) を回収する。一方、プラスミド p C M 71 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d I I で切断し、上記のベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含む H i n d I I \longrightarrow H i n d I I の DNA 断片と混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結させ、実施例 16 の方法に準じてアンビシリソナーゼ、クロラムフェニコールを耐性の形質転換株よりプラスミド p P S 1 (約 3.7 Kbp) を分離・精製した。このプラスミド p P S 1 においては、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域が、C A T 遺伝子の上流に同じ読み取り方向で挿入された構造を有している。第 17 図に p P S 1 の作成方法を示した。こうして得られたプラスミド p P S 1 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d I I で部分分解し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) の後、上記と同様にして 2ヶ所存在する H i n d I I サイトのうち 1ヶ所のみが切断された H i n d I I

領域を含む約 210bp の S a $\&$ I \longrightarrow H i n d I I の DNA 断片をエレクトロエリューション法により回収する。一方、プラスミド p B R 329 も同様にして制限酵素 H i n d I I 及び S a $\&$ I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) を行ない、ベクターの大部分を含む約 3.6 Kbp の H i n d I I \longrightarrow S a $\&$ I の DNA 断片を回収する。こうして得られた 2種類の DNA 断片を混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼで連結した後、上記方法に準じて、プラスミド p 329 P S を作成した。第 18 図に p 329 P S の作成方法を示す。

実施例 18 (F c 領域遺伝子ペリプラズム分認発現型プラスミドの作成)

実施例 11 で作成した F c 領域遺伝子菌体内発現型プラスミド p F C 362 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 S t I 及び E c o R I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) の後、t a c プロモーター領域・h 部位遺伝子・C a 2 部位遺伝子の前半部分を含む約 0.4 Kbp の E c o R I

R I \longrightarrow S s t II の DNA 断片と、ベクターの大部分・C₂ 2 部位遺伝子後半部分・C₃ 3 部位遺伝子を含む約4.5 Kbp の E c o R I \longrightarrow S s t II の DNA 断片とを、実施例 5 の方法に準じてゲルより回収する。このうちの t a c プロモーター領域・h 部位遺伝子・C₂ 2 部位遺伝子前半部位を有する E c o R I \longrightarrow S s t II の DNA 断片を、実施例 4 の方法により制限酵素 B s t N I で切断し、ボリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度 5%）の後、C₂ 2 部位遺伝子の一部を含む約17 1bp の B s t N I \longrightarrow S s t II の DNA 断片を、実施例 7 の方法に準じてゲルより回収する。さらに、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域と F c 領域遺伝子との連結部分に相当する。第19回記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチド（約51bp）を、実施例 8 の方法に準じて作成した。この E c o R I \longrightarrow B s t N I の DNA 断片中には、後のサブクローニングに必要な制限酵素 S a l I サイト、ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域遺伝子との連結

結のための制限酵素 H i n d III サイト、アミノ酸セリンをコードする T C A のコドン、h 部位遺伝子及び C₂ 2 部位遺伝子の一部が含まれている。この DNA 断片を用いることにより、大腸菌内で正しくシグナルペプチドが切断され、F c 領域蛋白質のアミノ末端にアミノ酸セリンが 1 個余分についた形の蛋白質の産生が期待できる。以上のようにして得られた、ベクターの大部分・C₂ 2 部位遺伝子後半部分・C₃ 3 部位遺伝子を含む E c o R I \longrightarrow S s t II の DNA 断片、C₂ 2 部位の遺伝子の一部を含む B s t N I \longrightarrow S s t II の DNA 断片、及びベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域と F c 領域遺伝子との連結部分に相当する E c o R I \longrightarrow B s t N I の DNA 断片とを混合し、実施例 5 の方法に準じて、プラスミド p S E C - F C (約4.7 Kbp) を作成した。第19回に p S E C - F C を示す。

こうして得られたプラスミド p S E C - F C を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断する。一方、実施例 17 で得られたベニシリナーゼ

遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスミド p P S 1 を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III で切断し、ボリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度 5%）の後、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を含む H i n d III \longrightarrow H i n d III の DNA 断片（約210bp）をエレクトロアリューション法により回収する。この DNA 断片を先に調製したプラスミド p S E C - F C の制限酵素 H i n d III 切断物と混合し、実施例 17 の方法に準じて、F c 領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミド p P S - F C を作成した。第20回に p P S - F C の作成方法を示した。

実施例 19 (F c 領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドの作成)

実施例 18 で作成したプラスミド p S E C - F C を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 B a m H I で切断し、実施例 8 の方法に準じて作成した制限酵素 C ℓ a I サイトを含む第19回記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチド（約14bp）と

混合し、実施例 2 の方法に準じて T 4 - DNA リガーゼを用いて連結反応を行なう。実施例 16 の方法に準じて、プラスミド p S E C - F C 中に存在する制限酵素 B a m H I サイトを制限酵素 C ℓ a I サイトに変換した形のプラスミド p S E C - F C C (約4.7 Kbp) を作成した。第19回にプラスミド p S E C - F C C の作成方法を示す。このようにして得られたプラスミド p S E C - F C C を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III 及び C ℓ a I で切断、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度 0.8%）の後、F c 領域遺伝子を含む約0.7 Kbp の H i n d III \longrightarrow C ℓ a I の DNA 断片を上記と同様に回収する。一方、実施例 16 で作成した分泌プラスミドベクター p E A P 8 を実施例 4 の方法に準じて制限酵素 H i n d III 及び C ℓ a I で切断、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度 0.8%）の後、プラスミド p E A P 8 の大部分を有する C ℓ a I \longrightarrow H i n d III の DNA 断片（約4.7 Kbp）を上記と同様に回収する。これら 2 種の DNA 断片を混合、実施例 2 の方法に準じて T 4 -

DNAリガーゼで連結させ、実施例16の方法に準じてFc領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10（約5.6Kbp）を作成した。第21図にpEXFC10の作成方法を示す。

一方、実施例18で得られたFc領域遺伝子ペリプラスミド分泌発現型プラスミドpPS-Fcを実施例4の方法に準じて制限酵素BamHI及びSalIで切断、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度0.8%）の後、ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域及びFc領域遺伝子を含む約0.9KbpのSalI→BamHIのDNA断片をエレクトロアリューション法により回収する。また、実施例16で得られた多コピー型分泌プラスミドベクターp329EXKを実施例4の方法に準じて制限酵素BamHI及びSalIで切断し、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度0.8%）の後、上記と同様にしてプラスミドp329EXKの大部分を含む約4.8KbpのBamHI→SalIのDNA断片を回収する。これら2種のDNA断片を実施例2の方法に準じてT4-

DNAリガーゼで連結し、実施例16の方法に準じてFc領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC100（約5.7Kbp）を作成した。第22図にpEXFC100の作成方法を示す。

実施例20（Fc領域蛋白質の分離発現確認）

前記実施例11で得られたFc領域遺伝子菌体内分泌発現型プラスミドpFC362を有するエシエリヒア・コリC600株、実施例18で得られたFc領域遺伝子ペリプラスミド分泌発現型プラスミドpPS-Fcを有するエシエリヒア・コリHB101株、及び実施例19で得られたFc領域遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10又はpEXFC100を有するエシエリヒア・コリHB101株を、最終濃度30μg/mlのアンビシリンを含むLBG培地（1%トリプン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、0.1%グルコース、0.2%グリセロール（pH7.2））に接種し、37℃で24時間振とう培養を行なう。ただし、プラスミドpEXFC10を有するエシエリヒア・コリHB101株の場合には、アンビシリンのかわりに最終濃度20

μg/mlのクロラムフェニコールを用いた。培養終了後、オスモティック・ショック法（C.Katoら、前出）により、培養物を、菌体外画分、ペリプラスミド画分、菌体内画分に分画する。すなわち、遠心分離によって菌体を分離した培養上清を菌体外画分とする。次に菌体を生理食塩水で洗浄した後、1mM EDTAを含む25%ショ糖水溶液に懸濁させて、37℃で10分間振とうする。遠心分離によって菌体を集めた後、菌体を氷冷した水に懸濁させ、4℃で10分間振とうする。この懸濁液に等量の0.1Mリン酸バッファー（pH7.0）を加えた後、遠心分離を行ない、菌体と分離した上清部分をペリプラスミド画分とする。さらに、この菌体を0.05Mリン酸バッファー（pH7.0）に懸濁させ、超音波により菌体を破壊する。遠心分離によって菌体残渣を除去した上清部分を菌体内画分とした。

得られた両画分のサンプルは、アセトン乾燥を行なった後、Tris-HClバッファー（pH6.8）、SDS、2-メルカプトエタノール、グリセロールを、それぞれ最終濃度60mM、2%、4%、

10%になるように加えて、SDS-ボリアクリルアミドゲル電気泳動（鈴木、遺伝、31、43（1977））を行なった。分離用ゲルは12.5%とし、泳動バッファーはSDS-Tris-グリシン系（U.K.Laemmli, Nature, 227, 680(1970)）を用いた。電気泳動終了後、ゲル中の蛋白質を、25mM Tris-192mMグリシン（pH8.3）-20%メタノールのバッファー中で、電気泳動的にニトロセルロース・フィルターに吸着させ、ウエスタン・ブロッティングを行なった。蛋白質を吸着させたニトロセルロース・フィルターを3%ゼラチンを含むTBSバッファー（20mM Tris-HCl（pH7.5）、500mM NaCl）中に60分間浸した後、一次抗体としてウサギ抗ヒトIgG-Fc成分抗血清（カッベル）を用いた間接法で、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いたイミュン・プロット・アッセイ、キット（バイオ・ラボ）により、ヒトIgG-Fc領域蛋白質を特異的に染色した。結果の一部を複写して第23図に示した。この際に、後記参考例記載の方法により

調製した既知量の天然型ヒト免疫 IgG Fc 領域蛋白質も同一の SDS-PAGE アクリルアミドゲルで電気泳動等を行なった。

第23図より、Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミド pFC362 を有するエシェリヒア・コリ C600 株の場合には、Fc領域蛋白質は菌体内外分にのみ局在しているのに対して、ペリプラズム分泌発現型プラスミド pPS-Fc を有するエシェリヒア・コリ HB101 株の場合にはペリプラズムまで、菌体外分泌発現型プラスミド pEXFC10 または pEXFC100 を有するエシェリヒア・コリ HB101 株の場合には菌体外表面にまで、それぞれ Fc領域蛋白質が分泌されていることがわかる。また、天然型 Fc領域蛋白質にくらべて大腸菌産生 Fc領域蛋白質の分子量が約5000ダルトン程度小さいという第23図の結果から考えて、大腸菌産生 Fc領域蛋白質には糖鎖の付加がおこっておらず、シグナルペプチドは除去されているものと思われる。

参考例 (天然型ヒト免疫グロブリン G Fc領域

蛋白質の調製)

0.3 g のヒト IgG (シグマ)、17.5 mg のシステイン、7.5 mg の EDTA・2Na を PBS バッファー (100 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、140 mM NaCl) に溶解し、150 μg のペバイン (シグマ、タイプIV) を添加して、37°Cで7時間放置する。ペバイン処理後の IgG を、PBS バッファーで平衡化したセファデックス G-200 スーパー・ファイン・ゲル (ファルマシア) を用いたゲル通過カラムにかけ、ペバイン処理によって生成した Fc領域蛋白質及び Fab領域蛋白質を、未反応の IgG と分離した。得られた Fc領域蛋白質と Fab領域蛋白質とを含む溶液を水に対して透析し、凍結乾燥によって標識した後、DE52・DEAEセルロース (ワットマン) を用いたイオン交換カラムにかけた。カラムを 10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で洗浄し、Fab領域蛋白質を完全に溶出させた後、NaCl 濃度を 0 mM から 350 mM まで直線的に変化させた 10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 用いて、Fc領域

蛋白質を溶出させた。上記と同様にして透析、凍結乾燥を行ない、天然型ヒト IgG Fc領域蛋白質を取得した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト IgG Fc領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミド pPS-Fc の DNA 基配列の一部と、それに対応する好アルカリ性ペプチド No.170 株ペニシリナーゼ・シグナルペプチドと Fc領域蛋白質のアミノ酸配列を示したものである。

第2図は、プラスミド pMB9 中に存在する K11 遺伝子の DNA 基配列を示したものである。

第3図は、好アルカリ性ペプチド No.170 株染色体 DNA 中に存在する Bxプロモーター領域の DNA 基配列を示したものである。

第4図は、ヒト IgG 遺伝子を含むファージ・クローンの制限酵素切断点地図と Fc領域遺伝子を含むサブクローンの制限酵素切断点地図とを示したものである。

第5図は、C_α 3部位遺伝子を含むプラスミド

pFC70 の作成方法を示したものであり、第6図は C_α 2-C_α 3部位遺伝子を含むプラスミド pFC77 の作成方法を示したものである。

第7図、第8図、第9図はそれぞれ Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミド pFC203、pFC211、pFC329 の作成方法を示したものである。

第10図は、プラスミド DNA の大腸菌からの分離・精製方法を示したものである。

第11図は、好アルカリ性ペプチド No.170 ペニシリナーゼ遺伝子のクローニングの方法を示したものである。

第12図、第13図、第14図、第15図は、菌体外分泌産生に関する情報を扱う DNA 領域を含むプラスミド pEAP3、pEAP6、pEAP7、pEAP7ΔH、pEAP7ΔCCH、pEAP7ΔCH、pEAP8、p329 EXK の作成方法を示したものである。

第16図は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子を含むプラスミド pM71 の作成方法を示したものである。

第17図、第18図は、ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスマド pPS1、pPS1ΔH、p329PSの作成方法を示したものである。

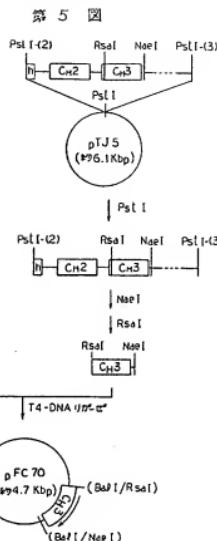
第19図は、シグナルペプチド領域遺伝子との連結用ジョイントを有する Fc 領域遺伝子を含むプラスミド pSEC-Fc、pSEC-FCC の作成方法を示したものである。

第20図は、Fc 領域遺伝子ペリブラズム分泌発現型プラスミド pPS-Fc の作成方法を示したものである。

第21図、第22図は、Fc 領域遺伝子細胞外分泌発現型プラスミド pEXFc10、pEXFc100 の作成方法を示したものである。

第23図は、Fc 領域蛋白質の分泌確認結果を示したものである。

代 理 人 弁理士 有 我 軒 一 郎
(外 1 名)



第 1 図 の (1)

TTTAAAGCGTAGAAAATTTGTACGCTTTGGTAATTACATAAAAGTATGCCAA
TGAAGATGAAACACATTGAGATGAAATTGCTAAATAGCTAAACTATTAGC
TTGAAAGAAAAGGGTGATAACATG-AAA-AAG-AAT-AGC-TTG-TTA-AAA-GTA-
Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
ACG-ATT-TCT-TCT-GTA-¹⁰⁰CAT-GCA-¹⁰⁰TCA-ACA-¹⁰⁰ACT-CAA-¹⁰⁰TTT-GTT-AGC-
Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-¹⁰⁰Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
GCA-CCT-GAA-CTC-CTG-GGG-GGA-CCG-TCA-GTC-¹⁵⁰TTC-CTC-¹⁵⁰TCA-CCC-
Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATG-ATC-TCC-²⁰⁰CGG-ACC-CCT-GAG-
Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-²⁰⁰Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
GTC-ACA-TGC-GTG-GTG-GAC-GTG-AGC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
Val-Ile-Thr-Cys-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
GTC-AAG-GTC-²⁵⁰AAC-TGC-TAC-GTG-GAC-GGC-GTG-GAG-GTC-CAT-AAT-
Val-Lys-Phe-Asn-Tyr-²⁵⁰Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-³⁰⁰CGG-CAG-GAG-CAG-TAC-AAC-AGC-ACG-TAC-
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Gln-Gly-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-

第 1 図 の (2)

CGG-CTG-GTC-AGC-GTC-CTC-ACC-GTC-CTG-CAC-CAG-GAC-TGG-CTG-⁵⁹
 Arg-Val-Lys-Val-Ser-Val-Lys-Thr-Val-Lys-Leu-His-Gln-Asp-⁶⁰
 Pro-Lys-⁶¹
 ATG-GCC-AAG-GAG-TAC-AAG-TGC-AAG-GTC-TCC-AAA-CAC-AAA-CCC-CTC-⁶²
 Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-⁶³
 CCA-GCC-CCC-ATC-GAG-AAA-ACC-ATC-TCC-AAA-GCC-AAA-GGG-CAG-⁶⁴
 Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-⁶⁵
 CGG-CGA-GAA-CCA-CAC-GCG-TGC-TAC-ACC-CTG-CCC-CCA-TCC-CGG-GAC-⁶⁶
 Pro-Are-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-⁶⁷
 Ser-Are-Glu-Gln-⁶⁸
 GAG-ATG-ACC-⁶⁹
 AAC-AAC-CAG-CTC-AGC-CTG-ACC-TCC-CTG-CTG-CTG-CTG-AAA-⁷⁰
 Glu-MET-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-⁷¹
 GGC-TTC-TAT-CCC-AGC-GAC-⁷²
 ATC-GCC-GTG-GAG-TGG-GAC-GAG-ACC-AAT-⁷³
 Gly-Phe-⁷⁴
 Pro-Ser-Asp-Ile-Lys-Val-Glu-Trp-Pro-Glu-Ser-Asn-⁷⁵
 GGG-CAG-CGG-GAG-AAC-AAC-TAC-⁷⁶
 AAC-ACC-ACC-CCT-CCC-CTG-CTG-⁷⁷
 Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Thr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Lys-⁷⁸
 GAC-TCC-GAC-GCC-TCC-TTC-CTC-⁷⁹
 ATT-TAT-AGC-AAG-GTC-ACC-GTC-ACC-GTC-⁸⁰
 Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-⁸¹
 Phe-Phe-Lys-Tyr-Ser-Ser-Lys-Ala-Thr-Thr-Val-⁸²
 GAC-AAG-AGC-AGG-TGC-CAG-CAG-GGG-AAC-GTC-⁸³
 TCC-TTC-TCA-TGC-CTC-⁸⁴
 AAC-Lys-⁸⁵
 Ser-Asp-⁸⁶
 Arg-Asp-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-⁸⁷
 Pro-Ser-Cys-⁸⁸
 Cys-⁸⁹
 ATG-ATG-CAT-GAG-GCT-CTG-CAC-AAC-CAC-TAC-ACC-GAG-CAG-AAC-⁹⁰
 GGC-⁹¹
 Val-I-MET-His-Gln-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-⁹²
 TCC-CTG-TCC-CCC-GGT-AAA-TAA-TAG-GATCC
 Leu-Ser-Lys-Ser-Pro-Cys-Lys-⁹³
 Ser-⁹⁴

第 2 圖

卷之三

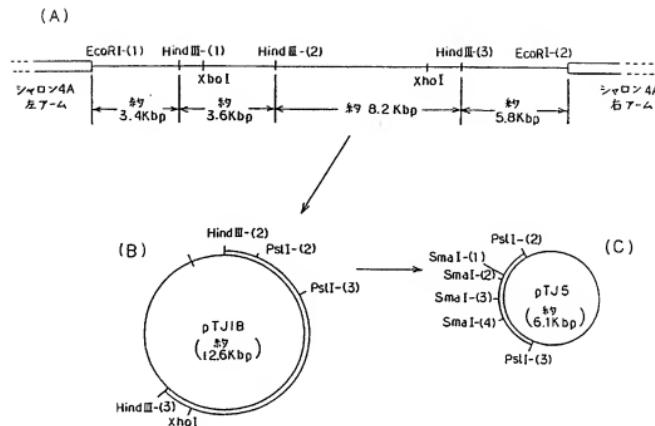
ATGAGGAAAGATTTTGTCGGATAATTCCGCAATAACCTCTTCTGGATGTCAGGCTAATCTATATACGTCATGTCAGGGGGGCG
 Met Ile Arg Lys Arg Phe Phe Val Ile Ile Phe Ala Ile Asp Leu Leu Val Ile Cys Glu Ala Asn Tyr Ile Arg Asp Val Val Ile Cys Glu Gly Thr

第 3 図

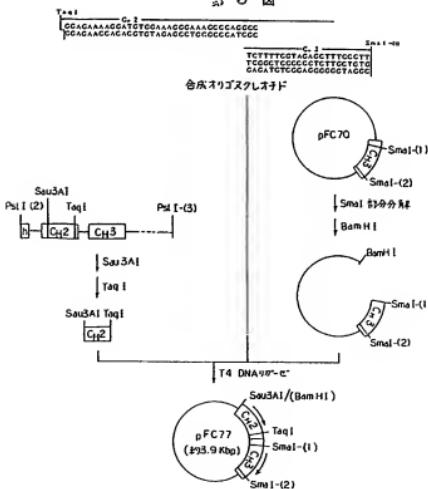
Exプロモーター

111c 8
 CAAACAAATA TGAACATGCTCA CAAATCTTAT ATATATATTG TGATTGATAT -3' 50
 TTTTCATG GCAATTACTCT TAAGGTCT ATCAATGATT GGGAGAGGGT CGGATGATAT
 120
 GTTTTCTTAT CAAATGACAC AAGGCCAACA GCGGCTTGTAA AACTAATGGG TGTGTTGGCC
 130
 GAAGAATCAAA ACCATGGCGA GTTACAAGA TACGGATTGTG TTGGCTAA AAGGAATTC
 140
 AGCTTATGGC ACACATGCTG CTCAGCTAGG GTATACGGAT GCATTTGAG ATGCTACAC
 150
 111c 9
 CAACAGACT TU KI 潘子

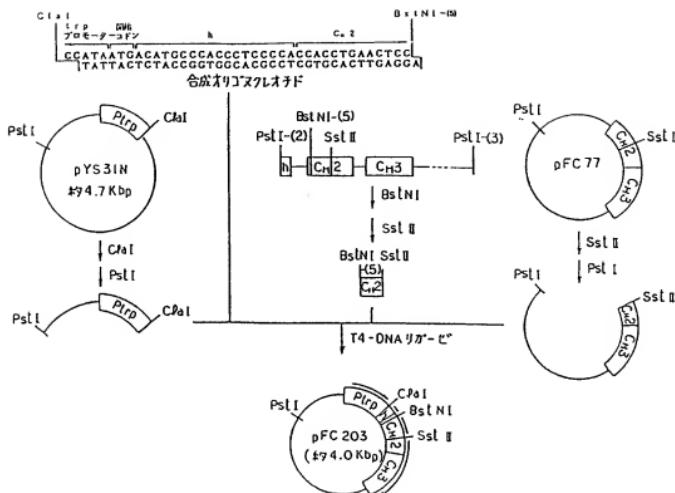
第 4 図



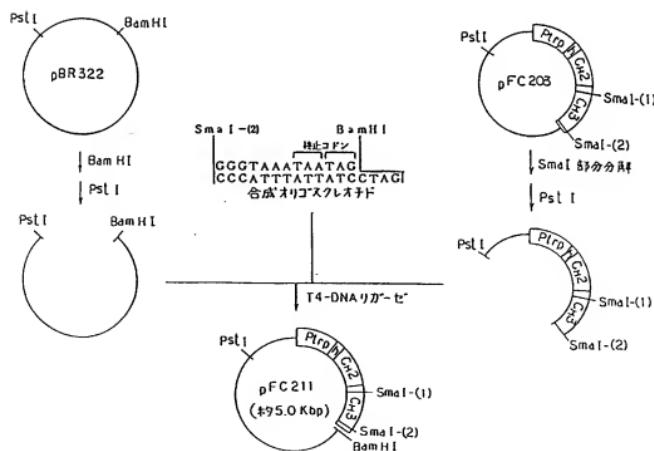
56

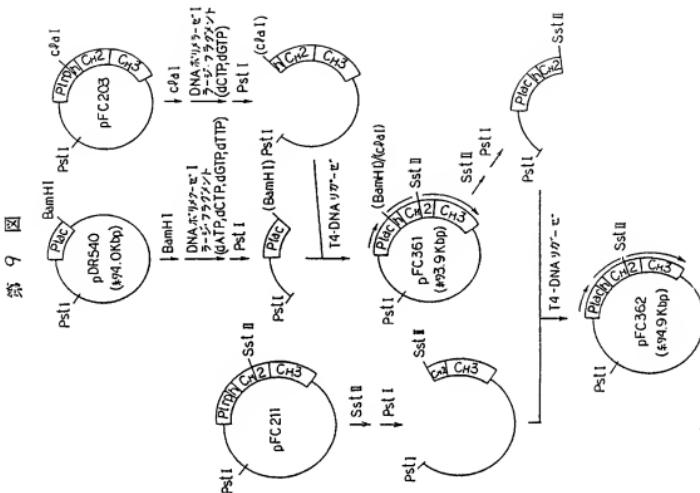


第7図



第8図





第10図の(2)

第10図の(1)

固体
 10m ℓ 、20%シラ糖、50mM Tris-HCl
 (pH 8.0)、1M EDTA、懸濁、水浴上
 50m ℓ ポリアロビレン製造槽
 2m ℓ 、0.25M EDTA
 1m ℓ 、リゾチーム (5mg/m ℓ 、0.025M
 Tris-HCl (pH 8))
 0.1m ℓ 、リボスクレアーゼA (10mg/m ℓ)
 混液 ゆるやかに混合、氷浴上15分～30分放置。
 5m ℓ 、3×トリトンX-100、ゆるやかに
 混合、
 水浴上15分～45分放置。
 漂心分離 17,000r.p.m.、4℃、40分
 上槽液
 250m ℓ ガラスびん
 2/3倍容量の蒸留水 (2回蒸留)
 2/3倍容量の冷たい氷浴相フェノール、ゆる
 やかに混合。
 漂心分離 6,500r.p.m.、4℃、15分

上層
 等量のフェノール：クロロホルム
 漂心分離 6,500r.p.m.、4℃、15分
 上層
 1/25倍容量の5M NaCl
 2倍容量のエタノール、-20℃で1晩放置
 漂心分離 6,500r.p.m.、-20℃、60分
 DNAベレット、過剰の液体を乾燥
 5m ℓ A-50バッファーに再溶解
 1m ℓ 滅菌80%グリセロール、ゆるやかに混合
 A-50カラム (2×35cm、1フラクション
 = 4m ℓ)
 DNA分離 (A₂₆₀ビーグ)
 2倍容量のエタノール、-20℃で1晩放置

第 10 図 の (3)

遠心分離 6500r.p.m. -20℃、60分

DNAベレット

2.1 ml T E N バッファー (20 mM Tris - HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) (5 ml 純度セルロース管)

2.2 g 塩化セシウム混液
(細胞筋に保持)

150 μl PBI (2 mg/ml) よく混合する。

2 ml 抗生物質

C + C デラジエント遠心分離、36,000r.p.m.
20℃、40時間

UVで観察
上方バンド：染色体ニックDNA
下方バンド：共有結合した凝固状プラスミドDNA

下方バンドのDNAを摘み、試める。

ダクエックス50W-XBカラム (UVで検出)
(細胞筋に保持)

第 10 図 の (4)

透析 (10 mM Tris - HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 2 ~ 4 ℥, 4℃ 一晩)

30 ml コルテックス遠心管

1/25 倍容量の 5 M NaCl
2倍容量のエタノール、-20℃で一晩放置

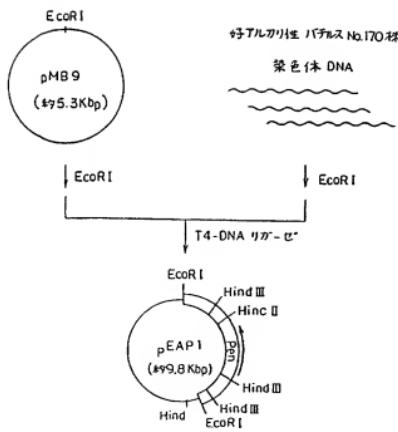
遠心分離 6,500r.p.m. -20℃、60分

DNA沈殿

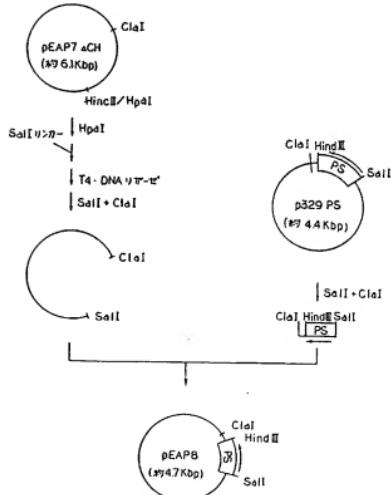
1 ~ 2 ml T E N バッファー

精製プラスミドDNA (1 mg/培養物 1 ml)
-20 ~ -70℃で貯蔵

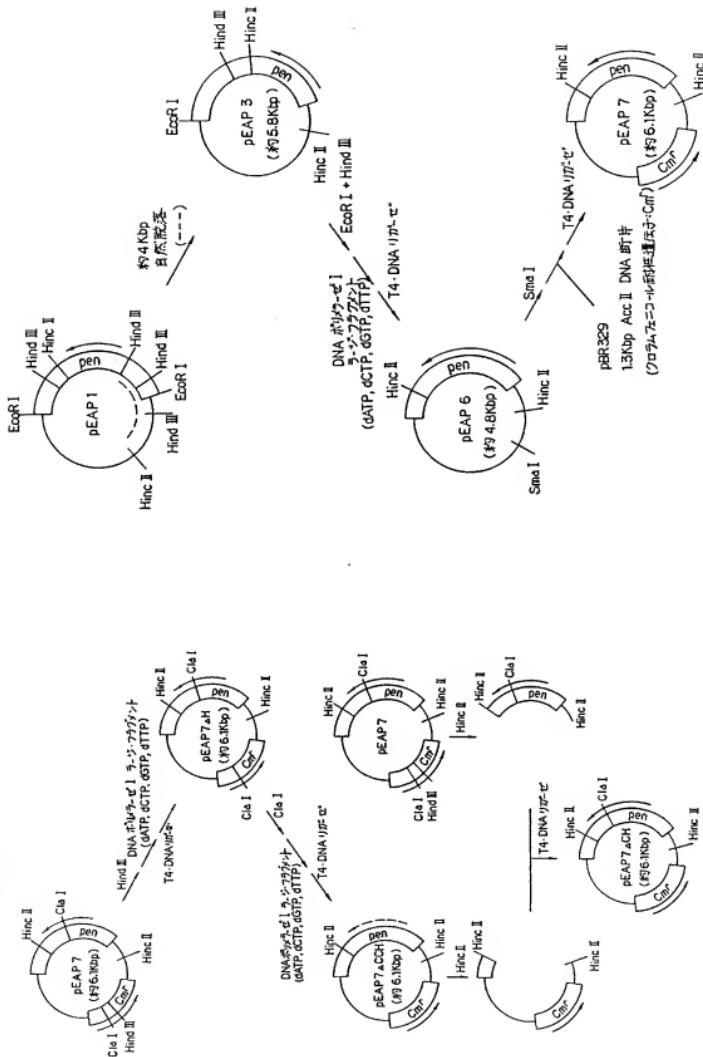
第 11 図



第 14 図

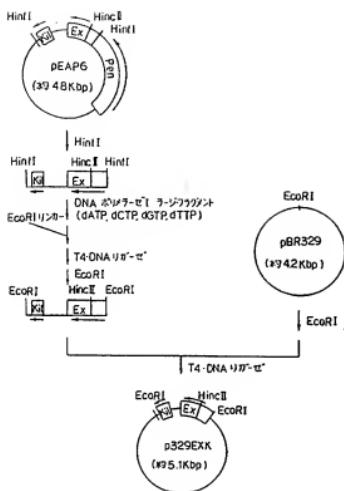


第12回

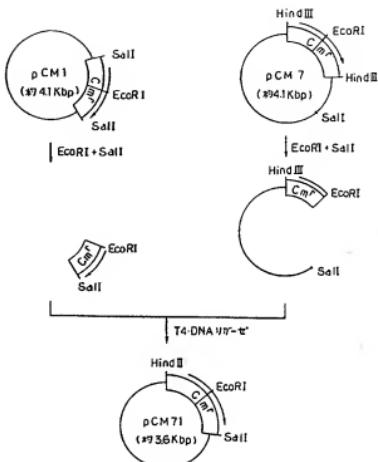


第13回

第 15 図



第 16 図



第 17 図

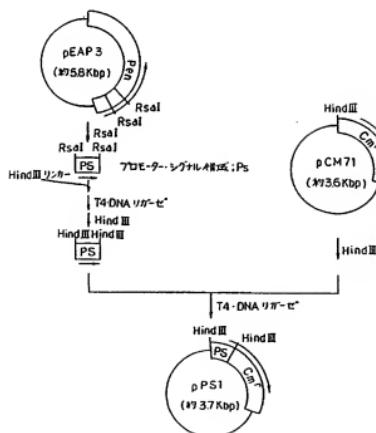


図 18

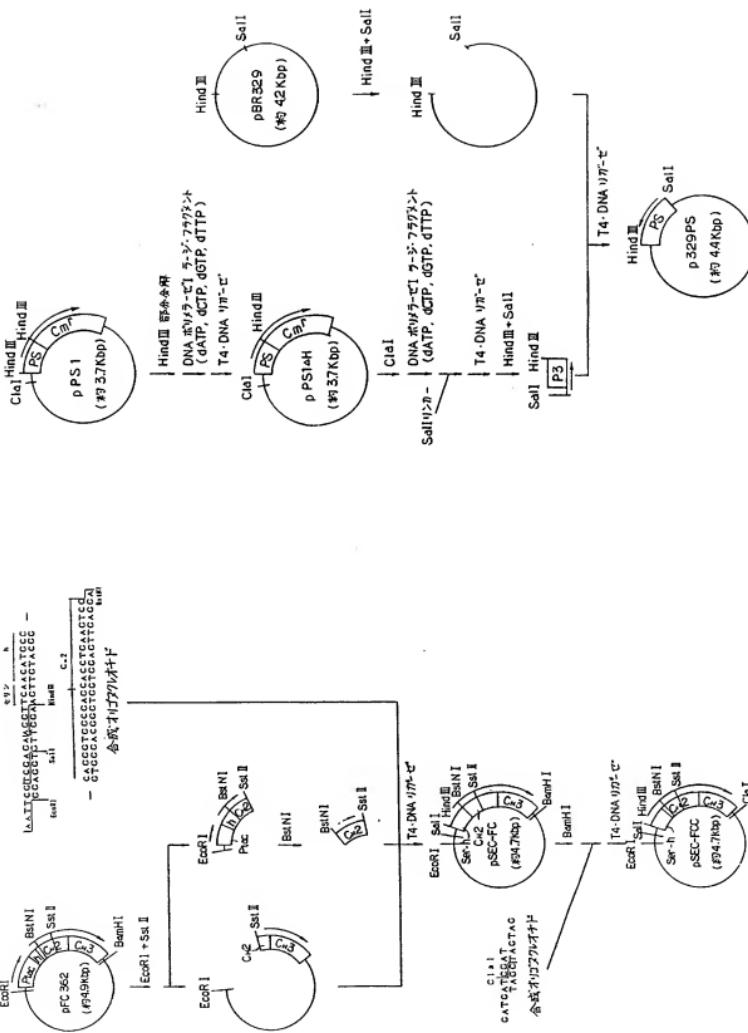
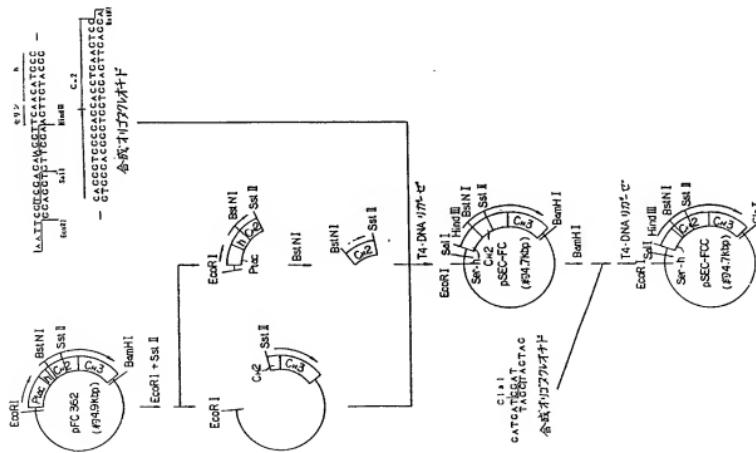
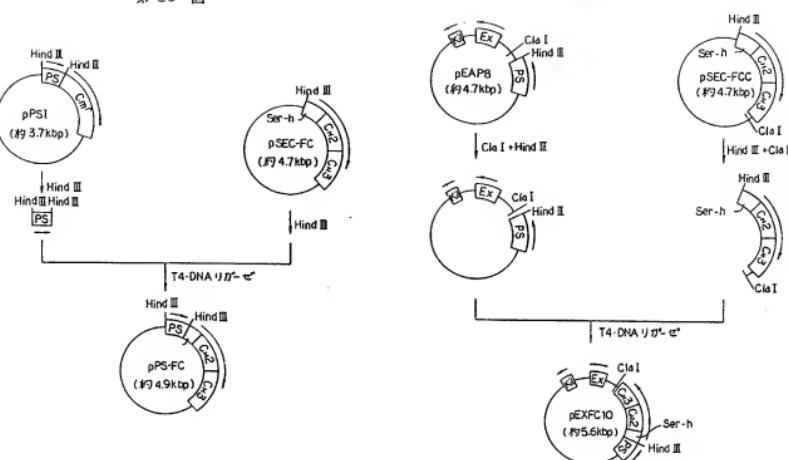


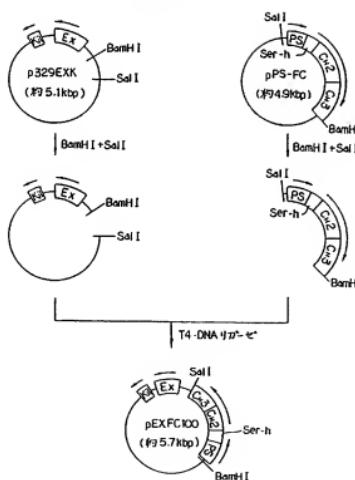
図 19



第20図

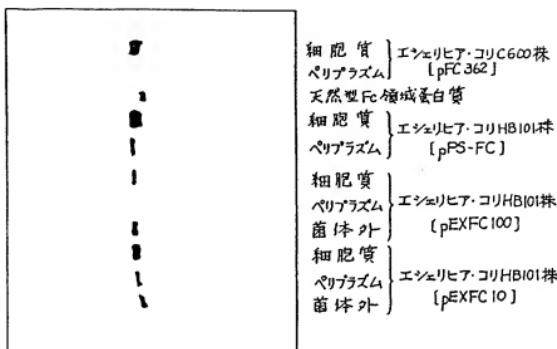


第22図



図面の添書(内容に変更なし)

第23図



手続補正書(方式)

昭和61年6月9日

特許庁長官 宇賀道郎 殿



1. 事件の表示

特願昭61-43531号

2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫
グロブリンG Fc領域蛋白質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士 (7260) 有我軍一郎



電話 370-2470

方式 横山

5. 補正命令の日付(発送日)

昭和61年5月7日

(発送日:昭和61年5月27日)

6. 補正の対象

図面。

7. 補正の内容

第23図を別紙の通り鮮明に描いたものに補正する(内容に変更なし)。

以上

手続補正書 (自発)

昭和61年8月13日

特許序長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

特願昭61-43531号



2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の製造法

3. 指定する者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士 (7260) 有我軍一郎

電話 370-2470



特許
61.8.15

あるのを、「PstIで切断し」と補正する。

⑩ 同第45頁第20行目に「一部を含む。」とあるのを、「一部を含む。」と補正する。

⑪ 同第55頁第18行目に「行い。」とあるのを、「行ない。」と補正する。

⑫ 同第56頁第16行目から第17行目に「また先に得られた」とあるのを、「また、先に得られた」と補正する。

⑬ 同...03頁第14行目に「断片を末端」とあるのを、「断片を、末端」と補正する。

⑭ 同第64頁第9行目に「クロラムフェニコール耐性」とあるのを、「クロラムフェニコール耐性」と補正する。

⑮ 同第65頁第10行目に「(約3.7 Kbp)」を作成した。」とあるのを、「(約3.7 Kbp)」を作成した。

⑯ 同第67頁第15行目に「相当する。第19図」とあるのを、「相当する第19図」と補正する。

⑰ 同第74頁第16行目から第18行目に「ペルオキシダーゼ標識抗体を……(バイオ・ラッド)」によ

5. 指定の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および図面。

6. 指定の内容

① 明細書第15頁第12行目に「Fc領域遺伝子」とあるのを、「Fc領域遺伝子」と補正する。

② 同第16頁第16行目に「I...プロモーター等があげられるが」とあるのを、「I...プロモーター等があげられるが」と補正する。

③ 同第25頁第10行目に「炭素源窒素源」とあるのを、「炭素源、窒素源」と補正する。

④ 同第27頁第16行目に「Alg」とあるのを、「Alg」と補正する。

⑤ 同第30頁第4行目に「連結を行い」とあるのを、「連結を行ない」と補正する。

⑥ 同第31頁第15行目に「amH1」とあるのを、「amH1」と補正する。

⑦ 同第38頁第3行目から第4行目に「アマーシャム製」とあるのを、「アマーシャム製」と補正する。

⑧ 同第39頁第9行目に「PstIを切断し」と

あるのを、「PstIで切断し」と補正する。

⑨ 同第45頁第20行目に「一部を含む。」とあるのを、「一部を含む。」と補正する。

⑩ 同第55頁第18行目に「行い。」とあるのを、「行ない。」と補正する。

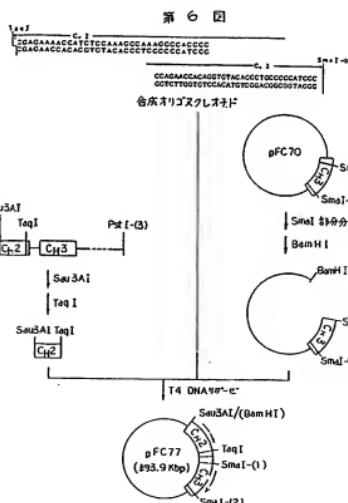
⑪ 同第56頁第16行目から第17行目に「また先に得られた」とあるのを、「また、先に得られた」と補正する。

⑫ 明細書に添付した第1図の①、第6図、第7図、第9図、第11図、第18図、第20図および第22図を別紙のとおり補正する。

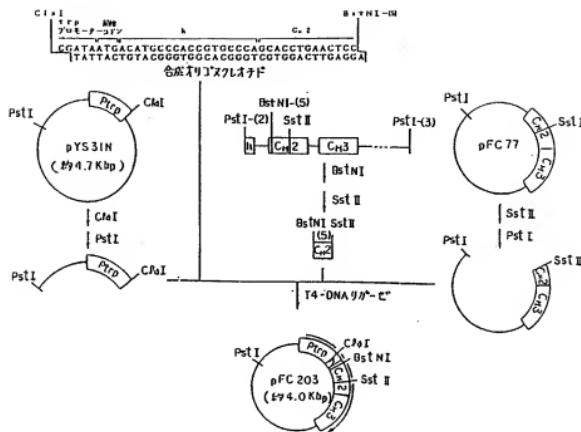
以上

第 1 図 の (1)

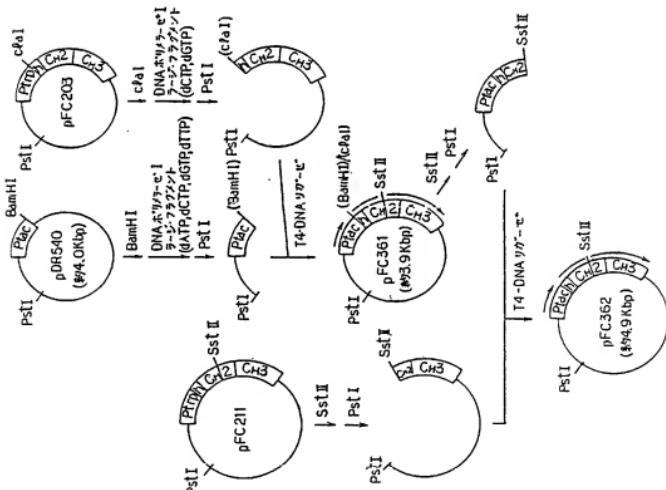
ACGCTTTTTGTTAATTACATAAAAGTATGCCAA
 TGAAGATGGAAGAACATTGAGATGAATTGCTAATATAGGTAAATAACTATTTAGC
 TTGAAAGAAAGGGTTGATAACATG-AAA-AAG-AAT-AGC-TTC-TTA-AAA-GTA-
 MET-Lys-Lys-Asn-Thr-Leu-Leu-Lys-Val-
 (1)
 GGA-TTA-TGT-GTA-⁵⁰ACT-TTA-CTA-GGA-ACA-⁵⁰ACT-CAA-TTT-GTT-AGC-
 Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
 (50)
 ACG-ATT-TCT-TCT-GTA-CAM-¹⁰⁰GCT-TCA-ACA-TGC-CCA-CCG-TGC-CCA-
 Thr-Lys-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
 (100)
 GCA-CCT-GAA-CTC-CTG-GGG-GGA-CCG-TCA-GTC-TTC-CTC-¹⁵⁰TTC-CCC-
 Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
 (150)
 CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATG-ATC-TCC-CGG-ACC-CCT-GAG-
 Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-Lys-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
 (200)
 GTC-AGA-TGC-GTC-GTG-GTC-GAC-GTC-AGC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
 Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
 (200)
 GTC-AAG-TTC-AAC-TGG-TAC-GTG-GAC-GCC-GTG-GAG-GTG-CAT-AAT-
 Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
 (250)
 GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-CCG-CAG-CAG-TAC-AAC-AGC-ACG-TAC-
 Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-
 (300)



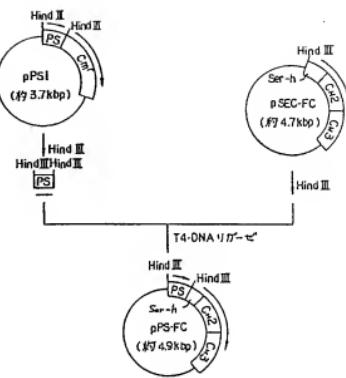
第 7 図



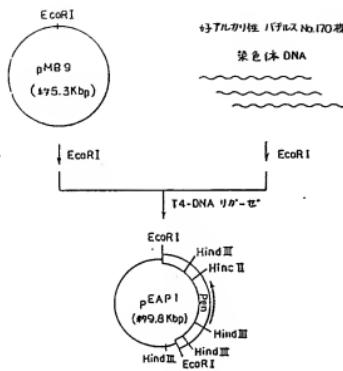
第 9 図



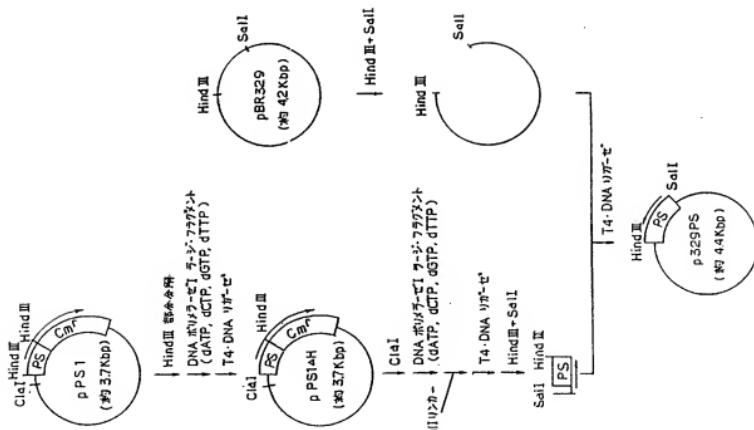
第 20 図



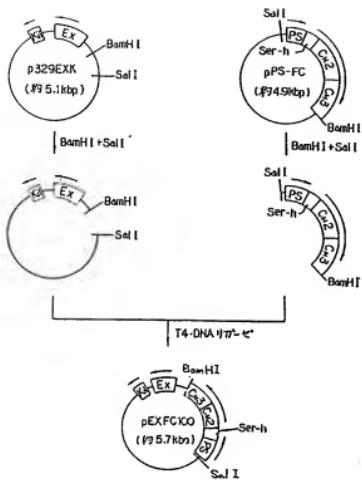
第 11 図



第 18 図



第22回



5. 捕正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄、「図面の簡単な説明」の欄および図面。

6. 捕正の内容

- (1) 明細書第7頁第2行に「結ばれている。」とあるのを「結ばれた二量体構造をとっている。」に訂正する。
- (2) 同第9頁第2行に「ついた状態で」とあるのを「結合した状態で」に訂正する。
- (3) 同第10頁下から第1行に「成功し、本発明を」とあるのを「成功し、更にそのFc領域蛋白質の大部はジスルフィド結合を介した二量体構造を有していることを見出し、本発明を」に訂正する。
- (4) 同第26頁下から第3行に「有無」とあるのを「有無およびその会合の状態」に訂正する。
- (5) 同第27頁第1行～第2行「確認できる。」のあとに次の文を挿入する。

「各画分からのヒトIgGFc領域蛋白質の精製は公知の通常知られている蛋白質の分離・精製

特許庁長官 黒田明雄 殿
昭和61年12月5日

1. 事件の表示

特願昭61-43531号

2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンGFc領域蛋白質の製造法

3. 捕正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679)理化学研究所 (外1名)

4. 代理人・平151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士(7260)有我章一郎

電話 370-2470



法に從えばよいが、抗ヒトIgGFc成分抗体を用いたアフィニティーカラム、クロマトグラフィーがとりわけ有利である。こうして得られたFc領域蛋白質精製品について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量解析、アミノ酸組成分析およびアミノ末端のアミノ酸配列解析を行なうことにより、シグナルペプチドが正しく切断されたFc領域蛋白質の分離が確認できる。」

(6) 同第28頁下から第4行「ドデシル硫酸ナトリウム」のあとに次の文を挿入する。

「また、特に明示しなければ、微生物細胞が產生したヒト免疫グロブリンGFc領域蛋白質には、その単量体蛋白質以外に、二量体等の多量体蛋白質も含まれるものとする。」

(7) 同第73頁下から第4行に「両画分」とあるのを「各画分」に訂正する。

(8) 同第75頁第1行に「免疫」とあるのを削除する。

(9) 同第75頁下から第7行～下から第2行に「ま

た、天然型Fc領域……ものと思われる。」とあるのを「また、菌体外画分をアセトン乾燥した後、Tris-HClバッファー(pH 6.8)、SDSグリセロールをそれぞれ最終濃度60mM、2%、10%になるように加えて、SDS-ポリアルリルアミドゲル電気泳動(分離用ゲル濃度12.5%)を行った。上記と同様な手法により、ヒトIgG Fc領域蛋白質を特異的に染色した結果の一部を複写して、第24図に示した。この際に、後期参考例記載の方法によつて調製した。天然型ヒトIgG Fc領域蛋白質も同一のSDS-ポリアルリルアミドゲルで電気泳動等を行つた。

第24図より、Fc領域遺伝子菌体外分認発現型プラスミドpEXFC10を有するエシリヒアコリHB101株が菌体外に分認したFc領域蛋白質は、その大部分が天然型Fc領域蛋白質と同様のジスルフィド結合を介した二量体構造をとっていることがわかる。

実施例21(分認Fc領域蛋白質の精製)

3mLの活性型アフィニティー支持体アフィー

ゲル10(バイオ・ラッド)と6.2mgのアフィニティー精製ヒツジ抗ヒトIgG-Fc成分抗体(カッペル)とを、0.1M MOPSバッファー(pH 7.5・半井化学薬品)中でカップリングさせて、ヒトIgG Fc領域蛋白質精製用アフィニティーカラムを作成した。4℃で2時間カップリングを行つたところ、用いたヒツジ抗ヒトIgG-Fc成分抗体の約40%が支持体上に固定化された。

前記実施例20で調製したFc領域遺伝子菌体外分認発現型プラスミドpEXFC10を有するエシリヒアコリHB101株培養物の菌体外画分の蛋白質を上記アフィニティーカラムに通し、Fc領域蛋白質のみを特異的にカラムに吸着させた。カラムをPBSバッファー[100mMリン酸バッファー(pH 7.4)、140mM NaCl]及び500mM NaClを含む20mMリン酸バッファー(pH 7.4)で充分洗浄した後、0.1Mグリシン-HClバッファー(pH 2.3)を用いて、Fc領域蛋白質を溶出させた。溶出したFc領域蛋白質を水に対して透析し、凍結乾燥した後に、実施例20

の方法に準じてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(分離用ゲル濃度12.5%)を行なつた。電気泳動終了後、ゲル中の蛋白質のバンドを銀染色試薬(第一化学薬品)を用いて染色したところ、98%以上の純度の大腸菌体外分認Fc領域蛋白質が得られたことが確認できた。

実施例22(分認Fc領域蛋白質の解析)

前記実施例21で得られた大腸菌体外分認Fc領域蛋白質精製品を、気相プロテインシーカンサー(アプライド、バイオシステムズ、モデル470A)にかけ、アミノ酸末端のアミノ酸配列解析を行つたところ、

H-N-Ser-Thr-()-Pro-Pro
-()-Pro-.....

という結果が得られた。この結果はペニシリナーゼのシグナルペプチドが分認の際に正しく切断されたことを示すものである。また、分認Fc領域蛋白質精製品を2%チオグリコール酸を含む6N

HCl中に110℃で22時間保つことによって加水分解した後、アミノ酸分析(日立B35型)

を用いたアミノ酸組成分析を行ない下記の結果が得られた。

アミノ酸	計算値 (モル%)	実験値 (モル%)
Asn/Asp	8.93	8.84
Thr	6.70	6.16
Ser	9.36	8.82
Gln/Glu	11.18	11.83
Gly	4.64	5.12
Ala	3.12	3.59
Val	10.27	9.45
Cys	2.68	2.57
Met	1.34	1.41
Ile	1.79	1.88
Leu	7.59	7.84
Tyr	4.02	4.07
Pro	3.12	3.22
Lys	8.48	8.66
His	2.68	2.73
Arg	2.68	2.81
Pro	9.82	9.65
Trp	1.79	1.33
合計	100.00	100.00

遺伝子の塩基配列より類推した計算値とよく一致していることから、大腸菌が菌体外に分認したFc領域蛋白質は計画通りのものであることがわかる。更に、天然型Fc領域蛋白質の分子量が約5000ダルトン程度小さいという第23図の結

果からみて、大腸菌が菌体外に分泌した F c 領域蛋白質には糖鎖の付加はおこっていないものと思われる。」に訂正する。

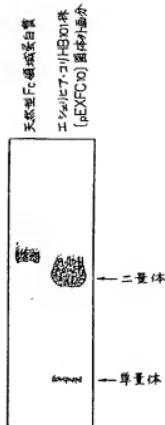
00 同第76頁第4行～第5行に「(100 mMリン酸バッファー (pH7.4)、140 mM NaCl)」とあるのを削除する。

00 同第79頁下から第3行の次に次の文を挿入する。

「第24図は、F c 領域蛋白質の構造確認結果を示したものである。」

00 図面の第24図を追加する。

第24図



以上